

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

Departamento de Biologia Animal



**Exposição a metais pesados no ambiente de trabalho:  
estabelecimento de bioindicadores de exposição a poluentes**

**Joana Manuela Dias de Sousa**

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2010

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

Departamento de Biologia Animal



**Exposição a metais pesados no ambiente de trabalho:  
estabelecimento de bioindicadores de exposição a poluentes**

**Joana Manuela Dias de Sousa**

Dissertação de Mestrado orientada por:

**Doutora Ana Maria Crespo (FCUL)**

**Doutora Teresa Pinheiro (ITN)**

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2010

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Instituto Tecnológico e Nuclear.

# ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 A exposição a metais pesados .....	1
1.2 Material particulado em suspensão no ambiente de trabalho.....	3
1.3 Toxicidade dos metais pesados na saúde humana .....	5
<i>Antimónio (Sb)</i> .....	6
<i>Arsénio (As)</i> .....	7
<i>Chumbo (Pb)</i> .....	9
<i>Crómio (Cr)</i> .....	11
1.4 Biomonitorização .....	12
1.5 Condensado do ar exalado (EBC) .....	14
2. OBJECTIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Delineamento experimental .....	17
3.2 Avaliação dos trabalhadores.....	18
3.2.1 Recolha do condensado do ar exalado (EBC) .....	18
3.2.2 Preparação de amostras para análise elementar.....	19
3.2.3 Caracterização química.....	20
ICP-MS.....	20
Microsonda Nuclear.....	23
3.3 Caracterização de material particulado em suspensão em ambiente de trabalho.....	25
3.3.1 Amostragem do material particulado em suspensão.....	25
3.3.2 Preparação das amostras e análise gravimétrica .....	26

3.3.3 Caracterização Química.....	27
PIXE.....	27
INAA.....	29
3.4 Análise Estatística .....	30
4. RESULTADOS .....	31
4.1 Caracterização dos grupos de amostragem .....	31
4.2 Caracterização do EBC .....	32
4.2.1 Caracterização elementar do EBC por ICP-MS .....	32
4.2.2 Análise de EBC por Microsonda Nuclear .....	35
4.3 Caracterização do material particulado em suspensão amostrado em ambiente de trabalho .....	36
4.3.1 Análise Gravimétrica do material particulado .....	36
4.3.2 Análise elementar do material particulado .....	37
5. DISCUSSÃO .....	42
6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
8. ANEXOS .....	55
8.1 O sistema experimental de PIXE e Microsonda Nuclear.....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Resumo dos efeitos observados na saúde (apresentados como uma aproximação das alterações na saúde em percentagem por aumento de $5 \mu\text{g.m}^{-3}$ do particulado fino).....	5
Figura 2 – Via de síntese do hemo.....	10
Figura 3 – Vias envolvidas na formação de lesões genéticas causadas por Cr .....	12
Figura 4 – Esquema representativo do delineamento experimental.....	17
Figura 5 – Representação do sistema de recolha do EBC.....	18
Figura 6 – Esquematização das alterações sofridas pela amostra na tocha do ICP-MS e configuração da região da interface.....	21
Figura 7 – Imagem da distribuição de Ca, Fe e Zn num depósito de EBC sobre um filme de policarbonato. ( $53 \times 53 \mu\text{m}^2$ ). A representação a partir do código de cores permite distinguir regiões de maior densidade de eventos e a sua morfologia. ....	24
Figura 8 – Esquema do colector Gent $\text{PM}_{10}$ . ....	25
Figura 9 – Espectro de raios X obtido num filtro de recolha de $\text{PM}_{2,5-10}$ exposto ao ambiente industrial com um feixe de 2,24 MeV e filtro de Mylar <sup>®</sup> com 350 $\mu\text{m}$ de espessura.....	28
Figura 10 – Espectros de radiação gama obtidos: uma semana após a irradiação (a) e três semanas após a irradiação da amostra (b) .....	30
Figura 11 – Concentrações elementares obtidas nas recolhas A e B por ICP-MS.....	33
Figura 12 – Médias estimadas de acordo como o género para os elementos Pb (1), Ni (2), Cu (3) e Zn (4) nas duas recolha de EBC dos trabalhadores.....	34
Figura 13 – Imagens de densidade e distribuição elementar de alguns metais ( $106 \times 106 \mu\text{m}^2$ ) obtidas em amostras de EBC de um indivíduo controlo (a) e de um trabalhador (b). ....	35
Figura 14 – Concentrações mássicas do material particulado suspenso no ar ( $\text{PM}_{2,5}$ , $\text{PM}_{2,5-10}$ e $\text{PM}_{10}$ ) nos ambientes de indústria e escritórios.....	37

Figura 15 – Concentrações médias elementares de material particulado nas fracções fina e grosseira em ambiente industrial e de escritório obtidas pelas técnicas PIXE e INAA. ....	38
Figura 16 – Razões entre as concentrações médias elementares do ambiente industrial e escritório. ....	40
Figura 17 – Razões entre as concentrações médias elementares das duas fracções granulométricas em ambiente industrial e de escritório .....	41
Figura 18 – Esquema representativo do sistema experimental de PIXE e microsonda nuclear instalado no ITN .....	60

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Caracterização dos indivíduos do grupo controlo e trabalhadores.	31
Quadro 2 – Concentrações elementares ( $\text{ng.mL}^{-1}$ ) obtidas por ICP-MS no grupo controlo e nas duas recolhas efectuadas no grupo de trabalhadores (Recolha A e B).....	32
Quadro 3 – Concentrações médias de alguns elementos obtidas na indústria ( $\text{ng.m}^{-3}$ ) e valores limite - média ponderada ( $\text{ng.m}^{-3}$ ) estabelecidos pela Norma Portuguesa NP1796. ....	39
Quadro 4 – Teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação dos grupos de controlo e trabalhadores (Recolha A).....	55
Quadro 5 – Teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação dos grupos de controlo e trabalhadores (Recolha B).....	55
Quadro 6 – Teste emparelhado de Wilcoxon não paramétrico para comparação da Recolha A e Recolha B .....	56
Quadro 7 – Teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação das concentrações elementares na fracção $\text{PM}_{2.5}$ recolhidas na indústria e nos escritórios .....	56
Quadro 8 – Teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação das concentrações elementares na fracção $\text{PM}_{2.5-10}$ recolhidas na indústria e nos escritórios Teste não paramétrico .....	57
Quadro 9 – Concentrações elementares e desvios padrão ( $\text{ng.m}^{-3}$ ) obtidos na indústria e escritórios para $\text{PM}_{2.5}$ , $\text{PM}_{2.5-10}$ e $\text{PM}_{10}$ .....	58
Quadro 10 – Razões das concentrações elementares $\text{PM}_{2.5}/\text{PM}_{10}$ recolhidas na indústria e nos escritórios.....	59
Quadro 11 – Teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação das razões das concentrações elementares $\text{PM}_{2.5}/\text{PM}_{10}$ recolhidas na indústria e nos escritórios. ....	59



## RESUMO

A exposição ambiental a poluentes, e em particular a exposição ocupacional, reveste-se de enorme importância dada a forte associação entre a exposição e os efeitos adversos na saúde humana sendo por isso um problema relevante em Saúde Pública.

Apesar da diversidade de matrizes biológicas possíveis de serem utilizadas na biomonitorização de agentes tóxicos, não existe até hoje uma matriz em que se possa estudar directamente a exposição por inalação. Assim, o EBC surge como uma matriz promissora e não invasiva na avaliação da exposição a poluentes.

Pretendeu-se avaliar a qualidade do EBC como bioindicador de exposição a metais no ambiente de trabalho. Com este objectivo foi estudado um grupo de trabalhadores de uma fábrica de produção de baterias exposto a Pb e outros metais e um grupo de trabalhadores de escritório, que constituiu o grupo controlo. Foi utilizada a técnica de ICP-MS para determinação das concentrações elementares no EBC e as técnicas nucleares de INAA e PIXE para quantificação das concentrações elementares em particulado em suspensão no ar.

A caracterização das partículas foi efectuada para duas granulometrias de particulado ( $PM_{2.5}$  e  $PM_{2.5-10}$ ). Foi ainda inspeccionada a presença de partículas atmosféricas no EBC por microscopia nuclear.

Para o grupo dos trabalhadores obtiveram-se concentrações elevadas de alguns elementos como o K, Ni, Cu, Zn e Pb no EBC. Verificou-se ainda a tendência para o aumento dos níveis de K, Ni e Pb ao longo da semana de trabalho embora as diferenças apenas fossem significativas para o K. As concentrações de Mn, Cu e Zn diminuíram no final da semana de trabalho o que poderá reflectir uma resposta fisiológica ao stress oxidativo provocado pelos metais inalados, mobilizando estes elementos essenciais para a activação de proteínas antioxidantes ou promovendo a sua retenção por aumento da expressão de metalotioneínas. A análise de EBC por microsonda nuclear permitiu visualizar partículas de 5 a 10  $\mu m$  nas amostras de EBC que se associavam a Pb e outros metais assim como a associação de elementos como o Zn à matriz do EBC ou uma fracção fina de particulado, o que é consistente com os resultados obtidos na caracterização do ambiente da fábrica. Verificou-se a associação de Cu, Zn e Sb à fracção de particulado mais fino  $PM_{2.5}$ , enquanto elementos como o Ni e Pb se associaram à fracção  $PM_{2.5-10}$ . Embora as concentrações elementares medidas na fábrica fossem elevadas relativamente ao ambiente de escritório, todos os valores estavam dentro dos valores limite estabelecidos na Norma NP 1796.

Este trabalho possibilitou a optimização das metodologias de análise e contribuiu para o estabelecimento do EBC como biomonitor de agentes tóxicos em exposição ocupacional.

**Palavras-chave:** Exposição ocupacional, metais pesados, material particulado em suspensão, condensado do ar exalado

## ABSTRACT

The exposition to environmental pollutants specially in the case of occupational exposure are of great interest due to the strong connection between time of exposure and adverse health effects in humans, becoming a relevant problem of public health.

Despite the diversity of the biological matrices used, we still miss one that enables the direct study of the exposition trough inhalation. In this scope, the EBC appears as a promising matrix, non-invasive in the assessment of exposure to pollutants.

We sought to assess the quality of the EBC as bioindicator of metal exposure in the workplace. With this objective it was studied a group of workers from a battery's industry and a group of office workers, who constituted the control group. We used the technique of ICP-MS for determination of elemental concentrations in EBC and nuclear techniques of INAA and PIXE for quantification of elemental concentrations in suspended particulate in the air.

The characterization of particles was performed for two particle sizes of particulate matter ( $PM_{2.5}$  e  $PM_{2.5-10}$ ). I was also inspected the presence of atmospheric particles in EBC by nuclear microscopy.

For the group of workers were obtained high concentrations of some elements such as K, Ni, Cu, Zn and Pb in the EBC. There was also a trend towards increased levels of K, Ni and Pb along the working week although the differences were significant only for K. The concentrations of Mn, Cu and Zn decreased at the end of the work week which may reflect a physiological response to oxidative stress caused by metal inhalation, mobilizing these essential elements for the activation of antioxidant proteins or promoting their retention by increasing metallothioneins expression. The analysis of EBC by nuclear microprobe allowed visualization of particles from 5 to 10  $\mu m$  in EBC samples that were associated with Pb and other metals as well as the combination of elements such as Zn to EBC or an array of fine particulate fraction, which is consistent with the results obtained in the characterization of the factory environment.

There was an association of Cu, Zn and Sb to the proportion of finer particles  $PM_{2.5}$ , while elements like Ni and Pb were associated with installment  $PM_{2.5-10}$ . Although the elemental concentrations measured in the factory were high for the office environment, all values were within the limit values in NP 1796

This work enabled the optimization of analytical methodology and contributed to the establishment of the EBC as biomonitor for occupational exposure to toxic agents.

**Keywords:** Occupational exposure, heavy metals, air particulate matter, exhaled breath condensate

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A exposição a metais pesados

Os metais pesados são, por definição, elementos químicos com uma massa atômica elevada e uma massa específica superior a  $5 \text{ g.cm}^{-3}$ . Alguns destes metais apresentam uma extensa área de interesse nas áreas ambiental e medicina ocupacional devido às evidências de que estes provocam doenças específicas. Recentemente, o desenvolvimento de novas metodologias veio possibilitar o estudo da dose e dos seus efeitos na saúde com maior precisão.[1]

A exposição a metais pesados ocorre há mais de 5000 anos, desde que o Homem iniciou a sua extracção e processamento. Ao longo de vários séculos, os metais pesados foram utilizados em diversas actividades do dia-a-dia. O chumbo tem sido utilizado desde a antiguidade em parte, devido à relativa facilidade de extracção e também em virtude das suas propriedades físicas e químicas como baixo ponto de fusão, ductibilidade e facilidade de formação de ligas. A sua aplicação foi vasta, nomeadamente em recipientes para cozinhar e armazenar alimentos, em materiais de construção, condutas de água, tintas e como adoçante na produção de vinho. Já o mercúrio era utilizado como um remédio para o alívio das dores de dentes e mais tarde para o combate da sífilis. O cádmio foi utilizado em meados do século XIX por Claude Monet em pigmentos de tintas.[1-4]

Estima-se que o processamento extenso de minérios de chumbo tenha libertado para o ambiente cerca de 300 milhões de toneladas de chumbo durante os últimos 5 milénios e que a maior parte das emissões tenha ocorrido nos últimos 500 anos. A partir da segunda metade do século XIX, com a Revolução Industrial, a exploração de metais pesados aumentou exponencialmente o que levou a uma concomitante amplificação das emissões para o ambiente. Estas emissões ocorrem por vários processos e vias: a combustão, extracção e processamento de materiais para o ar; lançamento de resíduos industriais para a água e absorção de águas contaminadas pelo solo, concluindo-se assim que a população tem vindo a estar significativamente exposta aos elementos metálicos. O uso de cerâmica mal vidrada, solda de chumbo em latas de alumínio, compostos de chumbo em tintas e cosméticos e níveis elevados de químicos na água de consumo resultaram também em taxas elevadas de morbilidade e mortalidade durante esta época.[2-4]

No século XX, com o advento dos veículos a motor e o uso de combustíveis fósseis contendo chumbo, as concentrações deste elemento na atmosfera atingiram níveis

máximos. Dado que esta era uma das mais relevantes fontes de poluição ambiental, foram tomadas medidas políticas eficazes em países desenvolvidos, nomeadamente a introdução de gasolina sem chumbo. Alguns estudos revelam que nos últimos 20 anos, os níveis de chumbo no sangue têm diminuído drasticamente; entre 1976 e 1991, o nível de chumbo médio na população Norte Americana baixou 78%, ( $12.8 \mu\text{g.dl}^{-1}$  para  $2.8 \mu\text{g.dl}^{-1}$ ) O mesmo se concluiu num estudo efectuado entre 1978 e 1988 em países desenvolvidos como a Bélgica, República Federal Alemã, Nova Zelândia, Suécia e Grã-Bretanha.[4]

Para além da exposição ambiental, a exposição ocupacional a agentes tóxicos também tem sido estudada. A relação entre a actividade profissional e os efeitos na saúde há muito que é descrita. A primeira publicação descrevendo uma associação entre o trabalho de mineração e a manifestação de doenças respiratórias data de 1556 na obra *De Re metálica* de Georg Bauer. Mais tarde, em 1700, Bernardino Ramazzini - considerado o pai da medicina no trabalho - publicou o livro *De morbis artificum diatriba* no qual descreve 54 doenças relacionadas com o trabalho de mineiros, químicos, fabricantes de vidro e trabalhadores que lidavam com cerâmica, ouro e prata.[1, 5]

Em 1949, Ronald Lane efectuou um trabalho pioneiro sobre a saúde de trabalhadores de indústrias de chumbo, estudo que conduziu a um controlo formal e eficaz da exposição ocupacional a este elemento.[2]

As unidades industriais como a fundição, soldadura, fábrica de baterias, cerâmica, plástico, vidro, entre outras, apresentam um elevado risco na saúde dos seus trabalhadores. O problema deve-se à presença de material particulado em suspensão constituído por elementos químicos como o arsénio, o chumbo, o crómio, o cobalto, o níquel e o mercúrio, considerados tóxicos ao organismo.[4]

Na maioria dos países industrializados, os controlos rigorosos e o melhoramento dos métodos industriais que têm sido impostos permitiram diminuir os casos de intoxicação por exposição ocupacional. Esforços normativos para estabelecer valores limite para a sua concentração no ar ajudaram a controlar a exposição a substâncias perigosas no local de trabalho. Actualmente, estão estabelecidos em muitos países os valores limite de exposição (VLE) para diversas substâncias libertadas no ambiente de trabalho no decurso da actividade industrial. Estes valores representam o valor máximo de concentração de uma dada substância libertada no ambiente por unidade de volume num dado período de tempo. Segundo a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*, para um determinado agente químico poderão existir simultaneamente diferentes tipos de valores limite de exposição ocupacional. Assim, é frequente utilizar a média ponderada do valor limite de exposição (VLE-MP) para a

avaliação da exposição ocupacional. O VLE-MP é definido como “a concentração média ponderada para um dia de trabalho de 8 horas e uma semana de 40 horas, à qual se considera que praticamente todos os trabalhadores possam estar expostos, dia após dia, sem efeitos adversos para a saúde”. Este VLE-MP é definido a nível nacional, podendo ser vinculativo (de cumprimento obrigatório) ou indicativo (dando uma ideia dos valores a atingir).[6, 7] Em alguns dos países em desenvolvimento, devido à ausência de regulamentação e controlo eficazes, a poluição de origem industrial, no que respeita ao ambiente exterior e à exposição ocupacional, continua a ser um problema ambiental grave com proporções significativas em termos de morbilidade e saúde pública.[4]

## ***1.2 Material particulado em suspensão no ambiente de trabalho***

Nas zonas industriais estão presentes diversos elementos químicos, geralmente sob a forma de material particulado em suspensão (do inglês *Air Particulate Matter* - APM), que se sabe actualmente, apresentarem riscos para a saúde humana. Este PM é uma mistura de partículas sólidas e gotículas suspensas num meio gasoso (ar) e que variam de tamanho, composição e origem. Dependendo do seu diâmetro aerodinâmico (DA), as partículas são geralmente divididas em partículas finas - com um DA igual ou inferior a 2.5  $\mu\text{m}$  - e partículas grosseiras - com um DA maior que 10  $\mu\text{m}$ , designando-se por PM<sub>2.5</sub> e PM<sub>2.5-10</sub>, respectivamente.[8]

Enquanto as partículas grosseiras são produzidas principalmente por processos mecânicos como actividades de construção, ressuspensão de poeiras e o vento, as partículas finas são originadas principalmente a partir de fontes de combustão. Em ambientes urbanos, tanto as partículas finas como grosseiras estão presentes podendo a proporção de partículas finas/grosseiras variar substancialmente entre cidades, dependendo da geografia local, meteorologia e fontes específicas de material particulado.[9]

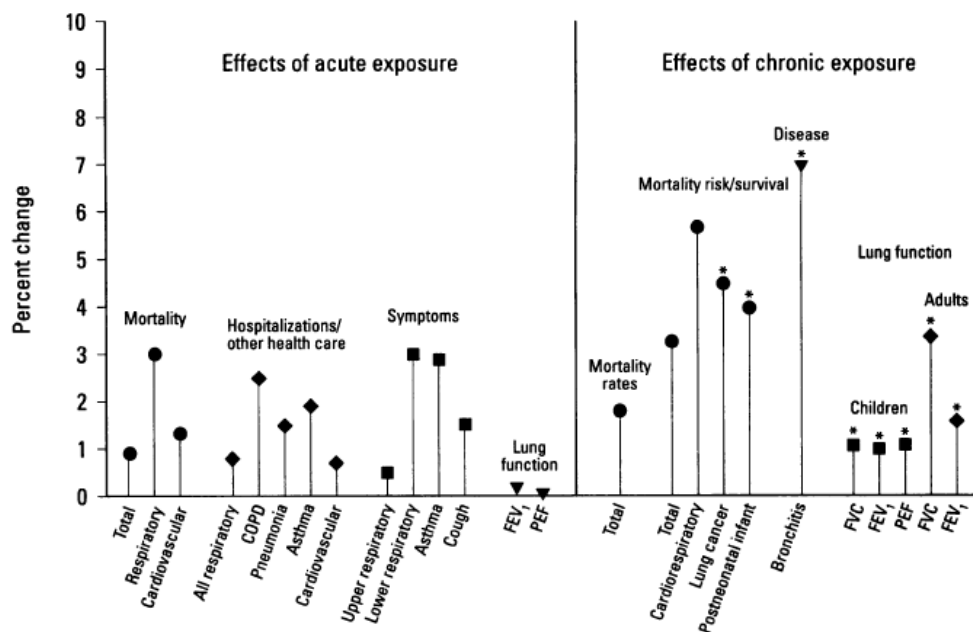
Apesar de se saber que existem diversas fontes de poluição em locais de trabalho industrial, existem poucos registos dos níveis de concentração de metais no ar ambiente das indústrias bem como o nível de contaminação dos trabalhadores fabris. Relativamente aos estudos que têm sido efectuados sobre doenças ocupacionais, geralmente referem-se a acidentes de trabalho e não a doenças ocupacionais desenvolvidas através duma exposição prolongada a baixos níveis de agentes tóxicos. Dado que muitos processos bioquímicos levam algum tempo a produzir efeitos nefastos e o início das doenças profissionais é semelhante a outras doenças crónicas,

a identificação e correlação da contaminação dos trabalhadores e a exposição torna-se bastante complexa e tem levado a poucos resultados conclusivos.[10, 11]

Actualmente, os estudos dos problemas da saúde associados ao material particulado têm sido feitos em ambiente exterior, demonstrando um aumento da mortalidade diária associada à exposição a APM com diâmetro inferior a 10  $\mu\text{m}$ . Essa associação é mais evidente no particulado fino que, devido à sua dimensão, tem uma maior capacidade de atingir os alvéolos pulmonares favorecendo o contacto directo com a corrente sanguínea e processos inflamatórios locais, enquanto as partículas grosseiras têm uma elevada probabilidade de se depositarem nas vias respiratórias superiores (mucosas nasal, bucal, traqueal e brônquios) sendo em parte expelidas, ingeridas e conseqüentemente lentamente removidas. As conseqüências mais directas desta poluição são as facilmente perceptíveis como: visibilidade reduzida da atmosfera e irritação dos olhos e garganta. No entanto, os efeitos a longo prazo são mais insidiosos e muito mais importantes.[8, 12-15] As evidências epidemiológicas dos efeitos da material particulado – especialmente o  $\text{PM}_{2.5}$  – na saúde humana são consistentes nos vários estudos publicados ao longo do tempo estando as estimativas dos efeitos resumidas na figura 1. Schwartz et al constatou que um aumento de 10  $\mu\text{g.m}^{-3}$  de  $\text{PM}_{2.5}$  estava associado ao aumento de 1,5% da mortalidade total em seis cidades dos Estados Unidos da América e 2,1% da mortalidade por doença isquémica. Embora neste estudo não ter sido verificada uma associação com o particulado de maiores dimensões ( $\text{PM}_{2.5-10}$ ), a associação entre  $\text{PM}_{2.5-10}$  foi encontrada em outros dois estudos realizados nas cidades de Los Angeles e Phoenix [15-17].

Uma vez que vários estudos utilizaram diferentes métodos de amostragem do particulado, delineamentos experimentais díspares e possíveis definições distintas dos casos clínicos, estas estimativas não são muito precisas, contudo, permitem obter uma ideia ilustrativa das conseqüências na saúde humana. É possível verificar alterações cardíacas e pulmonares que incluem visitas hospitalares de emergência devido a asma, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), alterações da função pulmonar e ainda morte por doenças cardíacas e pulmonares.[18]

A crescente consciência de que o modo como ocorre a degradação do meio ambiente pode influenciar a saúde, reflecte-se no aumento de estudos epidemiológicos e toxicológicos que permitem estimar a carga da doença (morbilidade e mortalidade) atribuíveis a fontes antropogénicas.<sup>[19]</sup> Contudo, estes estudos focam-se na biomonitorização da qualidade do ar em ambiente exterior havendo presentemente, pouco conhecimento quanto à constituição do material particulado em ambiente interior.



**Figura 1 – Resumo dos efeitos observados na saúde (apresentados como uma aproximação das alterações na saúde em percentagem por aumento de  $5 \mu\text{g.m}^{-3}$  do particulado fino).**

Abreviaturas: FVC - capacidade vital forçada; PEF - pico de fluxo expiratório. Asterisco (\*) indica a estimativa baseada em evidências muito limitadas ou inconsistentes. <sup>adaptado de [18]</sup>

### 1.3 Toxicidade dos metais pesados na saúde humana

O Homem está assim exposto a agentes químicos, físicos e biológicos potencialmente perigosos presentes no ar, solo, água e alimentos. Contudo, a exposição não resulta apenas da presença do agente no ambiente sendo que a palavra-chave na definição da exposição é o contacto. Este deverá ocorrer entre o agente e a barreira exterior do corpo humano como as vias respiratórias, a pele e a boca.[3]

Embora alguns metais sejam essenciais para o desempenho de vários processos bioquímicos, todos são considerados agentes tóxicos quando acima de determinada concentração. Esta relação entre a essencialidade e a toxicidade varia em função da natureza do metal e da espécie envolvida.[1]

Muitos metais quer sejam não essenciais como o antimónio (Sb), arsénio (As), chumbo (Pb), cádmio (Cd), crómio (Cr), ou essenciais à manutenção dos processos fisiológicos das células e tecidos, como o manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), selénio (Se), são poluentes ambientais que podem por vezes influenciar de forma irreversível os processos fisiológicos e bioquímicos. Podem alterar o balanço redox, interagir com proteínas tornando-as disfuncionais ou inactivando-as.[20]

Estudos epidemiológicos sobre a exposição ambiental e ocupacional a metais têm revelado a sua associação ao aparecimento de várias doenças do foro pulmonar,

neurológico, renal, cardiovascular, entre outras.[21, 22]

Apesar da relevância dos elementos na saúde humana, pouco se conhece sobre os mecanismos da sua toxicidade. As consequências da exposição a Al, As, Pb, Cd, e Cr na saúde humana têm sido mais estudadas. No entanto, os efeitos de outros elementos como o Sb e os elementos essenciais encontram-se ainda pouco explorados.

Seguidamente, e a título exemplificativo, descrevem-se os efeitos tóxicos na saúde humana de alguns metais com relevância ocupacional.

### *Antimónio (Sb)*

O antimónio é um elemento de elevada mobilidade nos ecossistemas e encontra-se naturalmente no ambiente como componente de certos minerais. Historicamente, o antimónio era utilizado em medicamentos. Actualmente, este elemento é utilizado em ligas de estanho e chumbo de modo a aumentar a sua rigidez, no fabrico de semi-condutores e na indústria química.[23]

Segundo alguns estudos, a exposição a concentrações ambientais de antimónio superiores a  $9 \text{ mg.m}^{-3}$  provocam irritações ao nível da pele, olhos e pulmões e esta exposição a longo termo pode resultar em doenças pulmonares como formação de antimoniose – uma forma particular de pneumoconiose – doenças cardíacas e gastrointestinais.[23, 24]

Um estudo recentemente efectuado em células estaminais humanas revelou que as nanopartículas de trióxido de antimónio (NP  $\text{Sb}_2\text{O}_3$ ) têm uma elevada toxicidade no desenvolvimento de colónias de eritrócitos. As NP  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  parecem ter uma interacção específica com algum componente celular envolvido na proliferação das células que darão origem aos eritrócitos. Num tratamento de 6h com NP  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  nestas células, observou-se alterações morfológicas, núcleos menores, cromatina mais condensada e vesículas de elevadas dimensões. Vinte e quatro horas após o tratamento, as células apresentavam corpos e núcleos apoptóticos.[25]

O trióxido de antimónio está também associado à diminuição dos níveis de IgG, responsáveis pela defesa do hospedeiro a infecções, IgE, mediadores da hipersensibilidade alérgica, de IL-2 e interferão gama, citocinas multifuncionais na imunidade mediada pelas células T.[23]

Outros autores associam ainda a exposição crónica a antimónio com perturbações cromossomais que consequentemente potenciam problemas mutagénicos e oncogénicos.



## *Arsénio (As)*

O arsénio é um elemento químico muito frequente na ecosfera estando presente em rochas eruptivas, fosfatos naturais, carvões e pirites. É considerado o agente tóxico mais conhecido pelo Homem dado que foi utilizado desde a idade média até à idade moderna como veneno.[26]

A exposição ao arsénio pode ocorrer sob três formas: pela ingestão de alimentos e água contaminados, por inalação de ar contaminado, aerossóis ou partículas e por via cutânea. A exposição por inalação ocorre em unidades industriais de fundição de chumbo, cobre e zinco, combustão de combustível fóssil, indústrias de semicondutores e na produção de pesticidas.

A exposição aguda, seja de arsénio ingerido ou inalado, podem danificar os tecidos e inúmeros órgãos incluindo o sistema nervoso, respiratório, cardiovascular, o tracto gastrointestinal e a pele. A exposição crónica ao arsénio tem sido associada a arritmia cardíaca, a exacerbação das complicações da diabetes, toxicidade hepática e renal, anemia, leucopenia e vários tipos de cancro. Pode ocorrer ainda a redução da medula óssea, hemólise, melanose e polineuropatia.[26]

A nível bioquímico, a toxicidade celular deve-se, principalmente, à forma trivalente de arsénio que apresenta uma elevada afinidade com os grupos tiol de proteínas e enzimas causando inibição de uma grande variedade de processos oxidativos intracelulares. É o caso de inibição de enzimas mitocondriais e consequente bloqueio da fosforilação oxidativa, a ligação ao ácido tióico que leva a perturbações no metabolismo dos glícidos (uma vez que a inibição do coenzima do piruvato desidrogenase resulta numa diminuição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise).[27, 28]

A ligação a grupos tiol, causa também a inibição de enzimas envolvidas na reparação e expressão do DNA. Ocorre ainda uma diminuição dos níveis intracelulares de NADH e um défice na produção de ATP celular - devido à inibição da respiração mitocondrial - e consequente aumento da produção de peróxido de hidrogénio, que por sua vez, pode causar um aumento de espécies reactivas de oxigénio (EROs). Estes, reagem com as bases de purinas e pirimidinas e a desoxirribose do DNA causando quebras nas cadeias de DNA e consequente aumento da probabilidade de fragmentação de cromátídeos/cromossomas.

Estudos recentes referem que o arsénio interfere com o cistosqueleto e a formação do fuso mitótico causando um aumento de células micronucleadas e estimula a produção de proto-oncogenes.[27, 28]

## *Cádmio (Cd)*

O cádmio é um elemento que se encontra disperso por todo o ambiente e que contacta com o organismo por várias vias como a comida, a água, o ar e o fumo de tabaco.

É utilizado nas indústrias de baterias juntamente com níquel, vidro, metalurgias, entre outras. A forma mais comum de exposição ocupacional é a inalação de partículas ou de fumos gerados durante o aquecimento ou soldadura de materiais contendo cádmio. Dependendo do tamanho das partículas, este elemento pode ter uma taxa de absorção entre 10 a 50%. [29]

Relativamente à absorção, o cádmio apresenta uma maior absorção respiratória que gastrointestinal. No sangue é acumulado principalmente nos eritrócitos e liga-se a proteínas de baixo peso molecular (albuminas, globulina e metalotioneína). Actualmente, sabe-se que a metalotioneína desempenha um importante papel na homeostase de cádmio e uma função protectora contra a toxicidade deste elemento uma vez que, o metal intracelular ligado à proteína não tem efeitos tóxicos. [30]

O cádmio foi reconhecido como um elemento tóxico quando se percebeu que era o agente causador da doença Itai-Itai no Japão, uma doença caracterizada pela lesão do túbulo proximal renal, resultando num aumento dos níveis de cádmio na urina, aminoacidúria, glicosúria renal e diminuição da reabsorção tubular do fosfato. Segundo um estudo de registos clínicos de pacientes com uremia, concluiu que os indivíduos que habitavam próximos de áreas industriais emissoras de cádmio (<2 Km) apresentavam o dobro do risco de desenvolver insuficiência renal crónica. [3, 30]

Também foi demonstrado que o cádmio compete com o metabolismo do cálcio e altera as vias de fosforilação.

O cádmio provoca lesão testicular o que resulta em necrose, degeneração tecidular podendo levar a perda de produção de espermatozóides. Estas lesões resultam da redução do fluxo sanguíneo e consequente diminuição de oxigénio no testículo. A necrose testicular pode causar hiperplasia nas células de Leydig e consequentemente formação de tumor. [30]

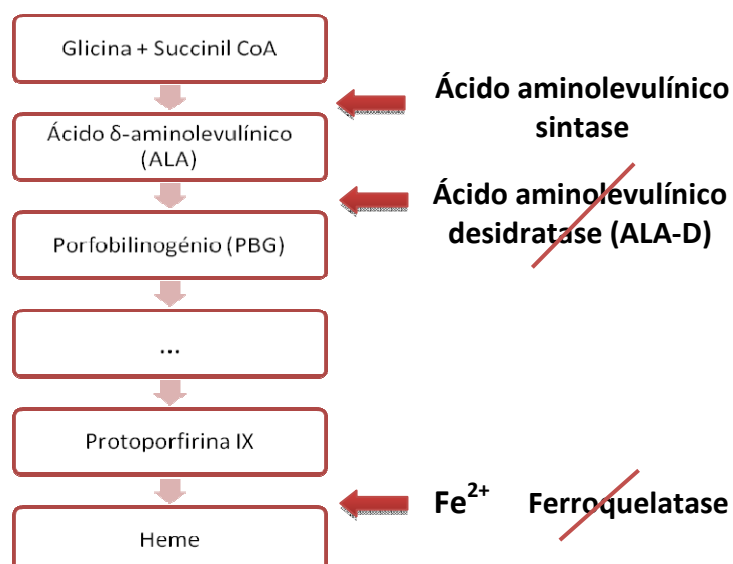
A Agência Internacional de Pesquisas do Cancro (IARC) classifica assim o cádmio como um agente cancerígeno humano do tipo I, tendo sido associado ao cancro da próstata e cancro renal. [3]

## *Chumbo (Pb)*

O chumbo foi dos primeiros metais a ser utilizado e actualmente é o agente tóxico mais estudado. Está largamente distribuído por todo mundo fazendo parte de diversos minerais, entre os quais o mais importante é a galena (sulfureto de chumbo). A generalização da sua utilização numa grande variedade de aplicações pode ser atribuída, principalmente, à abundância do metal na natureza e à sua facilidade de extracção do meio ambiente. Além disso, o chumbo é um elemento simples de trabalhar (altamente maleável e dúctil) e de fácil fundição. É utilizado em muitas indústrias, incluindo fundição e processamento de chumbo, fabrico de baterias, plástico, cabos, munições e cerâmica, na soldadura e em processos de reciclagem de baterias.[2-4]

O chumbo é absorvido primeiramente pelo tracto gastrointestinal e pelos pulmões. Estudos concluem que 20 horas após a exposição, 78% do chumbo absorvido está concentrado nos ossos (25% dos quais na medula óssea), 2% no sangue e o restante encontra-se no fígado, rins e tecidos moles.[31, 32]

A toxicidade do chumbo resulta, principalmente, da sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, azoto ou oxigénio (grupos  $-SH$ ,  $-H_2PO_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ), que funcionam como dadores de electrões. As interacções com proteínas podem levar à formação de corpos de inclusão intranucleares no túbulo proximal renal e ainda promover a abertura de poros e consequente libertação do citocromo c para o citoplasma activando a morte celular por apoptose. O chumbo tem a capacidade de substituir o ião cálcio o que conduz ao bloqueio da entrada de cálcio nos terminais nervosos com consequências no processo de neurotransmissão, inactivação dos ATPases dependentes de cálcio, sódio e potássio afectando o transporte membranar e a alteração da conformação da calmodulina comprometendo as vias relacionadas com o cAMP.[31, 33, 34] O chumbo é também um potente inibidor da via de síntese do hemo. No processo de síntese do hemo, por acção do ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (ALA-D ou porfobilinogénio sintase), duas moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) ligam-se para formar o porfobilinogénio. De seguida, formam-se as proteínas uroporfirinogénio III, coproporfirinogénio III, a protoporfirinogénio IX e a protoporfirina IX. Nesta última proteína é incorporado o ião ferro através do enzima ferroquelatase formando o hemo (figura.2).[31, 33-35]



**Figura 2 – Via de síntese do hemo.**

A presença de chumbo no organismo leva à inibição da actividade do ALA-D com consequente acumulação de ALA no sangue que se pensa afectar o sistema nervoso devido à semelhança estrutural da molécula e o neurotransmissor γ-ácido aminobutírico (GABA). Uma outra alteração na via de síntese do hemo é a inibição do enzima ferroquelatase que conduz à acumulação de protoporfirina IX nos eritrócitos. Deste modo, ao invés de incorporar o ferro, a protoporfirina IX incorpora o catião zinco formando a protoporfirina de zinco (PPZ).[35-38]

A PPZ é uma proteína vulgarmente utilizada nos Estados Unidos no programa de monitorização de trabalhadores expostos a chumbo. Alguns estudos indicam que a medição dos níveis de PPZ é um método mais adequado para a análise da exposição a chumbo, do que a determinação de chumbo no sangue. Uma das razões apontadas baseia-se na correlação entre as elevadas concentrações da proteína PPZ e os sintomas e anormalidades clínicas. Contudo, recentemente esta ideia tem sido refutada dado que a PPZ parece apresentar elevada variabilidade individual e pouca sensibilidade ao período de exposição ao chumbo. Também o aumento das concentrações de PPZ pode resultar do aumento de bilirubina e carboxihemoglobina e não de exposição a chumbo, sendo por isso actualmente considerada um indicador pouco específico.[38]

O chumbo tem ainda a capacidade de alterar locais de ligação de zinco em canais receptores e inibir proteínas reguladoras da transcrição genética como as proteínas contendo dedos de zinco.[27]

As patologias associadas à exposição ao chumbo são a anemia, cefaleias, depressão, fadiga, sonolência, dores musculares, dores nos ossos e articulações, diminuição da

fertilidade, hipertensão, neuropatia periférica, insuficiência renal e nefropatia crónica. É considerado, segundo a IARC, um agente potencialmente carcinogénico nos humanos estando associado ao aumento do cancro dos pulmões, estômago e bexiga.[31, 34]

### Crómio (Cr)

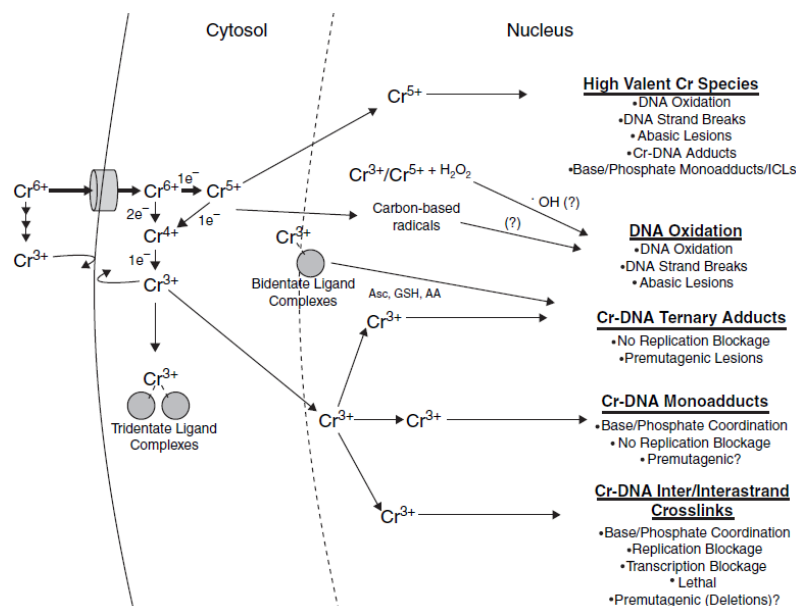
O crómio encontra-se vulgarmente nas rochas e solos e é empregue nas indústrias de soldadura, na produção de aço inoxidável e no cortume. Devido à utilização de crómio em diversas actividades antropomórficas, a contaminação de solos e águas subterrâneas tornou-se uma fonte de preocupação para a saúde ao longo da última década.[27] Os casos relatados de intoxicação por crómio registam afecções respiratórias agudas e crónicas como inflamação pulmonar, enfizema e diversos tipos de cancro.[39]

O impacto que o crómio tem na saúde depende da forma iónica (responsável pela sua mobilização, subsequente absorção e consequente toxicidade). O crómio apresenta duas formas estáveis, crómio hexavalente Cr (VI) e trivalente Cr (III) – existindo ainda outros estados de valência instáveis em sistemas biológicos. O Cr (III) é a forma iónica quimicamente mais estável, com uma toxicidade e taxa de absorção no tracto gastrointestinal relativamente baixas e encontra-se associado a matéria orgânica no solo e ambientes aquáticos. Já o Cr (VI), é considerada a forma mais tóxica quando associado, geralmente, a oxigénio como cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) ou dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ).[27]

O crómio (VI) tem sido reconhecido com um agente carcinogénico em mamíferos, incluindo o Homem. Pensa-se que as espécies mutagénicas são, para além do Cr (VI), uma ou várias espécies intermediárias produzidas na redução de Cr (VI) a Cr (III), isto porque, testes *in vitro* com Cr (VI) revelam que apenas ocorrem danos no DNA na presença de agentes redutores (figura 3).

Dos diversos agentes redutores presentes nas células, o glutathione (GSH) parece ser o principal agente de redução do crómio dado que se encontra numa elevada concentração no citoplasma, apresenta um potencial de redução favorável e tem a capacidade de produzir os intermediários Cr (V) e Cr (IV).[27]

Os intermediários do Cr (VI) podem ligar-se a bases de DNA levando à oxidação destas moléculas e ainda, participar em reacções semelhantes à reacção de Fenton com o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) formando radicais hidroxilo e o anião superóxido. Este stress oxidativo gerado leva a quebras na molécula de DNA.[27]



**Figura 3 – Vias envolvidas na formação de lesões genéticas causadas por Cr.<sup>[27]</sup>**

O crómio é um metal genotóxico e clastogénico, com capacidade de induzir mutações génicas, alterações cromossomais (ex. micronúcleos) e formar ductos de DNA (ligação de  $\text{Cr}^{3+}$  a guaninas), que podem levar a formação de tumores.

## 1.4 Biomonitorização

Devido aos efeitos nefastos provocados pela exposição a metais e apesar da legislação já existente para a exposição a agentes tóxicos à saúde humana a nível ocupacional, uma constante monitorização e rastreio são essenciais para uma melhor qualidade de vida e condições de trabalho. Assim, actualmente, a saúde dos indivíduos expostos a agentes tóxicos é estimada através da medição de poluentes ambientais ou por biomonitorização.

Na biomonitorização determina-se a concentração de um agente tóxico a partir de amostras biológicas inferindo-se os níveis de exposição recente ou passada a esse mesmo agente. Apesar da biomonitorização mostrar ser uma ferramenta mais poderosa que a monitorização ambiental na determinação da dose total do agente tóxico absorvido pelo organismo, apresenta uma elevada variabilidade biológica ao nível da absorção, distribuição, biotransformação e excreção do próprio agente. Assim, a biomonitorização dos elementos químicos pressupõe o estudo das várias matrizes biológicas e o conhecimento fisiológico e bioquímico dos elementos tóxicos nas mesmas.[1, 40, 41]

Ao longo das últimas cinco décadas, o sangue e a urina têm sido os fluidos biológicos de primeira escolha na determinação da exposição a metais tanto para efeitos de rastreio como de diagnóstico.[33, 41]

Apesar de se pensar que as medições de elementos químicos no sangue reflectam a exposição recente aos mesmos, também podem representar a exposição passada/longo termo, como é o caso do chumbo que apresenta uma mobilidade do osso de volta para o sangue. Estudos em indivíduos sem uma exposição excessiva a chumbo concluem que 45-75% deste elemento no sangue deverá ter origem no osso. Outros autores afirmam ainda que devido à correlação estatística entre os níveis de chumbo no sangue e efeitos na saúde ser tão baixa, o sangue não é um meio biológico sensível da exposição ou dose nos órgãos alvo. Além disso, em termos de cinética da distribuição dos elementos químicos no organismo (sangue, osso e tecidos moles), a diferenciação entre exposição crónica em doses baixas e a exposição pontual em doses elevadas não é possível com base apenas na medição dos níveis dos elementos químicos no sangue. Consequentemente, existe um interesse em matrizes alternativas que poderão ajudar no estudo da exposição aos agentes tóxicos. Tais alternativas incluem a determinação das concentrações dos metais em saliva, osso, fezes, urina, unha e dente.[33, 41]

A urina é uma matriz biológica não invasiva, facilmente obtida e bastante útil na biomonitorização a longo termo, especialmente na exposição ocupacional. Contudo, este meio reflecte os elementos químicos que foram difundidos no plasma e excretados pelos rins. Deste modo, a urina apresenta uma variabilidade biológica que é influenciada pelo funcionamento do rim e não sendo apenas uma matriz de excreção. Assim, a actividade renal pode alterar significativamente a excreção dos metais independentemente das alterações da exposição ou concentrações no organismo.[1, 40]

O cabelo, e com menor extensão a unha, são vulgarmente utilizados na determinação da concentração de elementos traço - indicadores de estados de deficiência nutritiva – e na demonstração de estados de envenenamento em medicina forense. Actualmente, têm sido alvo de atenção na biomonitorização, dadas as suas vantagens: recolhas fáceis e não invasivas, custos mínimos, relativamente isolados de outras actividades metabólicas do organismo e de fácil armazenamento e transporte para análise. Contudo, têm sido reconhecidos vários problemas na aplicação destas duas matrizes biológicas na monitorização.[1, 40]

Relativamente ao cabelo, a capacidade de distinguir o metal endógeno (absorvido no sangue e incorporado na matriz do cabelo) e o metal exógeno (derivado de contaminação externa) revela ser a grande dificuldade na manipulação desta amostra

biológica. Um estudo recente revela que o método de lavagem de cabelo proposto pela *International Atomic Energy Agency* (IAEA) – acetona/água/acetona – falhava na remoção de chumbo exógeno. Um outro problema é a variação significativa de concentração de metais dependendo da idade, género, cor de cabelo e hábitos tabágicos. Além disso, factores geográficos, étnicos e ecológicos podem igualmente afectar a distribuição dos elementos metálicos no cabelo, dificultando deste modo o estabelecimento de intervalos de referência. Segundo a Agência para Substâncias Tóxicas e Registo da Doença (ATSDR), estes problemas necessitam de ser resolvidos para que a análise do cabelo seja uma ferramenta útil no conhecimento da exposição ambiental.[33]

Já a determinação da concentração de metais na unha apresenta uma dependência da idade não ocorrendo o mesmo para o género do indivíduo. Estudos de avaliação da contaminação por chumbo realizados em unhas revelaram que, apesar do procedimento rigoroso da lavagem, existe uma grande variabilidade na medição de chumbo nas mesmas unhas dos pés e das mãos de vários indivíduos sugerindo assim, uma baixa reprodutibilidade desta matriz o que introduz sérias limitações na avaliação da exposição aos metais.[33, 42]

Assim, novas matrizes biológicas têm sido investigadas para estudos de biomonitorização. É o caso do condensado do ar exalado, do inglês *Exhaled Breath Condensate* (EBC), recentemente introduzido como um potencial meio biológico na avaliação de patologias respiratórias. A sua utilização na determinação de bioindicadores de processos oxidativos em situações de inflamação das vias respiratórias chamou a atenção da comunidade científica para esta matriz, fazendo emergir o EBC como uma ferramenta não invasiva na avaliação da exposição a poluentes.[43-45]

### **1.5 Condensado do ar exalado (EBC)**

Na procura de métodos não invasivos para a avaliação da exposição individual, surge a possibilidade de diagnóstico baseado na análise de produtos exalados na respiração. Na última década, tem havido um aumento significativo na investigação da inflamação das vias respiratórias através da análise do EBC. O EBC apresenta uma elevada potencialidade na monitorização dos processos inflamatórios e oxidativos das vias respiratórias dado que permite o acesso aos fluidos das superfícies de revestimento pulmonar sem a necessidade de indução de muco ou de lavagem broncoalveolar, métodos que geram desconforto, apresentam riscos e considerados



de carácter invasivo.[43, 44, 46]

A recolha do EBC é efectuada por um método fácil e não invasivo, que se baseia na refrigeração do ar exalado sob condições de respiração normal/espontânea e na ausência de estimulações desagradáveis das vias respiratórias, como a indução de expectoração. Esta matriz biológica é constituída essencialmente por vapor de água (99% do volume) e uma fracção de partículas respiratórias não voláteis. Os compostos possíveis de ser identificados no ar exalado são inúmeros, como por exemplo gases inorgânicos (óxido de azoto, monóxido de carbono), gases orgânicos voláteis (acetona, amónia, peróxido de hidrogénio), substâncias não voláteis (péptidos, citocinas, isoprostanos), material particulado, entre outras.[44, 45]

Diversas substâncias do ar alveolar humano provêm do sangue por passagem pela membrana alveolar através de difusão passiva. Deste modo, o ar exalado poderá reflectir aproximadamente as concentrações arteriais das substâncias biológicas, revelando-se uma matriz bastante vantajosa já que pode ser facilmente repetida não induzindo inflamação. Uma outra vantagem da utilização do EBC é a de fornecer informação directa das vias respiratórias, não obtida por outros meios.[47]

Um estudo recente utilizando um método inovador com nanopartículas de ouro, conseguiu discriminar o ar exalado de pacientes com cancro (pulmão, mama, colorectal e próstata) e indivíduos saudáveis através da identificação de compostos voláteis presentes no EBC. O crescimento de um tumor é acompanhado por alterações nos genes e/ou nas proteínas que pode levar à peroxidação de componentes celulares e consequente emissão de compostos orgânicos voláteis. Estes compostos presentes no sangue podem ser transportados para os pulmões através de trocas gasosas e assim, ser mensuráveis na respiração.[48]

Considerando que o EBC é constituído praticamente por água e está livre de potenciais interferências de solutos, este pode representar uma matriz ideal na determinação de elementos químicos presentes. Contudo, através de pesquisa de trabalhos publicados, conclui-se que esta caracterização elementar tem sido pouco estudada. A análise elementar do EBC poderia assim ser usada no conhecimento dos níveis de metais pneumotóxicos e elementos traço nos tecidos alvo e com isso saber a probabilidade de efeitos locais resultarem de espécies altamente reactivas ou pouco solúveis retidas nos pulmões.[44]

Assim, testes efectuados no ar exalado podem ser úteis numa nova abordagem de doenças clínicas, na evolução de vários distúrbios conhecidos, no conhecimento de exposição a compostos orgânicos voláteis e na caracterização elementar.

## 2. OBJECTIVOS

A crescente preocupação sobre a degradação do meio ambiente e da sua influência na saúde, reflecte-se no aumento de estudos epidemiológicos e toxicológicos que permitem estimar a morbilidade e mortalidade atribuível a fontes poluentes antropogénicas.

Os efeitos nefastos da exposição a metais para a saúde humana, exige uma constante monitorização dos agente tóxicos a fim de se obter uma melhor qualidade de vida e condições no local trabalho. Com a procura de métodos não invasivos para a avaliação da exposição individual, surge a possibilidade de diagnóstico baseado na análise de produtos exalados na respiração, como o condensado do ar exalado (EBC). Deste modo, o principal objectivo desenvolvido neste trabalho foi o de avaliar a qualidade do EBC como bioindicador de exposição a metais no ambiente de trabalho.

Para atingir este objectivo, foi efectuada a:

- determinação das concentrações elementares no EBC por ICP-MS com vista à caracterização de trabalhadores expostos a metais no ambiente de trabalho;
- caracterização ambiental da unidade industrial seleccionada, através da amostragem do particulado em suspensão por diferentes granulometrias e posterior determinação elementar pelas técnicas PIXE e INAA.

A qualidade do EBC como indicador de exposição será estimada pela relação entre as concentrações de metais em diferentes fracções de particulado em suspensão no ambiente de trabalho e as concentrações de metais no EBC ao longo da semana de trabalho. Serão ainda estudados aspectos como a heterogeneidade do EBC utilizando técnicas de microscopia nuclear e a influência das variáveis demográficas nos níveis de concentração de metais no EBC e na sua variabilidade durante a semana de trabalho.

Espera-se assim poder amplificar o conhecimento do EBC como matriz biológica, otimizar as metodologias de análise e contribuir para o estabelecimento do EBC como bio-indicador de exposição a metais.

Este trabalho inseriu-se no âmbito do projecto de investigação FCT/PTDC/AMB/65828/2006 - Condensado do ar exalado: um indicador não invasivo da exposição individual a poluentes?

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental

Para a caracterização ambiental e avaliação da exposição dos trabalhadores, foi seleccionada uma unidade industrial de fabrico de baterias que processa essencialmente chumbo, situada nos arredores de Lisboa. A fábrica opera em turnos de 5 dias consecutivos e 8 horas de trabalho diárias.

Os trabalhadores foram avaliados duas vezes durante a semana de trabalho. Recolheram-se duas amostras de EBC a todos os trabalhadores voluntários, a primeira no início do turno do primeiro dia de trabalho e a segunda no fim do turno do último dia de trabalho. Realizou-se também uma avaliação médica para observação clínica e avaliação de função pulmonar. Foram também registados os últimos valores de chumbo no sangue.

A realização deste projecto teve o consentimento dos trabalhadores que estavam devidamente informados dos objectivos do trabalho, do tipo de recolha e análises a serem feitas, bem como do fim a que se destinavam.

Para além do grupo de trabalhadores fabris, efectuou-se uma única recolha de EBC num grupo de indivíduos não expostos - grupo controlo. Os indivíduos do grupo controlo trabalhavam todos num organismo público, situado na área geográfica da indústria seleccionada.

Na altura da recolha de EBC foi preenchida uma ficha individual com os dados de cada indivíduo trabalhador/controlo (idade, sexo, hábitos tabágicos e anos de exposição, para o caso dos trabalhadores).

Para a caracterização ambiental, efectuou-se uma amostragem do material particulado (PM) em diversos pontos das instalações fabris, tendo em atenção as áreas de trabalho e a exposição a que os trabalhadores estavam sujeitos. Realizou-se também a recolha do particulado em ambiente de escritório, nas instalações onde foi constituído o grupo de controlo, utilizando os mesmos métodos (figura 4).



Figura 4 – Esquema representativo do delineamento experimental.

## 3.2 Avaliação dos trabalhadores

### 3.2.1 Recolha do condensado do ar exalado (EBC)

As recolhas das amostras de EBC foram realizadas com o equipamento EcoScreen<sup>®</sup> (Jaeger, Wurzburg, Alemanha), um aparelho de recolha do ar exalado com um sistema de refrigeração que condensa o ar expirado e armazena-o em fase líquida. Para tal, o indivíduo deve sentar-se comodamente, colocar uma pinça nasal e respirar pela boca tranquilamente e sem esforço para o bocal do sistema durante aproximadamente 15 minutos. Após a passagem por duas válvulas filtro unidireccionais do aparato, o ar exalado é refrigerado por uma câmara a -15°C e recolhido sob a forma dum condensado num tubo de recolha (figura 5).

O condensado obtido durante o tempo de recolha é tipicamente de 1 a 3 ml.

Os tubos de recolha são previamente lavados com ácido nítrico (HNO<sub>3</sub> suprapur<sup>®</sup>, Merck), passados abundantemente por água ultrapura (Milli-Q Element System, Milipore) – resistividade superior a 18 MΩ.cm – e secos numa câmara de fluxo laminar. O material descartável é usado apenas uma vez por indivíduo e o não descartável é desinfectado em lixívia (cerca de 2 horas) com posterior limpeza com água destilada e etanol, após cada utilização. Todo o material é levado para o local de recolha em sacos de plástico para evitar contaminações.

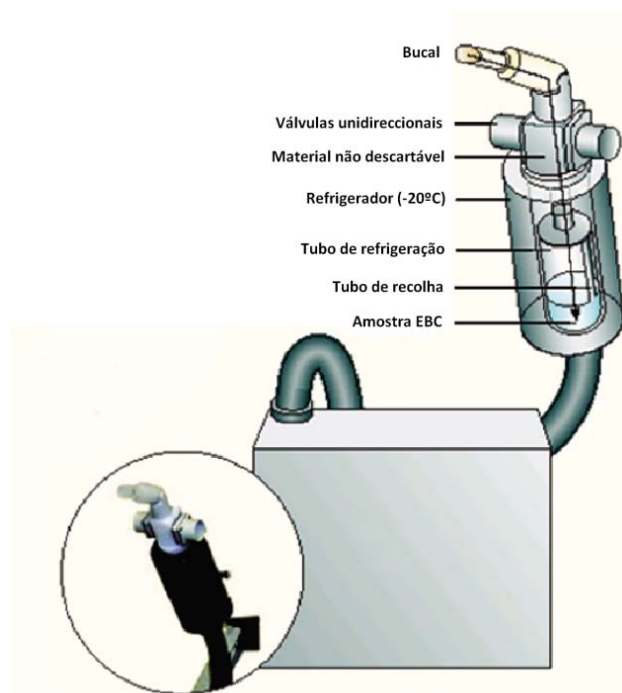


Figura 5 – Representação do sistema de recolha do EBC. adaptado de [46]

### 3.2.2 Preparação de amostras para análise elementar

Todo o material de polietileno ou polipropileno utilizado para armazenamento e processamento das amostras foi previamente lavados por imersão em HNO<sub>3</sub> (suprapur<sup>®</sup>, Merck) a 50% v/v durante pelo menos 8 dias, passados abundantemente por água ultrapura (Milli-Q Element System, Milipore) – resistividade superior a 18 MΩ.cm – e secos numa câmara de fluxo laminar.

As soluções padrão e os brancos foram preparados em material de politetrafluoretileno (Teflon<sup>®</sup>) previamente descontaminado em banho fervente de HNO<sub>3</sub> 50% v/v de modo diminuir a contaminação das soluções com metais.

Todos os procedimentos de manuseamento e preparação das amostras foram realizados em laboratório limpo (classe C ISO 7) e com recurso a uma câmara de fluxo laminar.

#### *ICP-MS*

O EBC recolhido foi transferido para um tubo de polipropileno e acidificado com 3% de HNO<sub>3</sub> suprapur<sup>®</sup>, agitado num banho de ultra-sons durante 10 minutos e armazenado a -80 °C até análise elementar por ICP-MS do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*).

Para a análise elementar por ICP-MS utilizaram-se 500 µL de amostra de EBC, à qual foi adicionado o padrão interno de modo a obter a concentração de Y final de 10 µg.L<sup>-1</sup> após diluição em água ultrapura de modo a perfazer 2,5 mL

Preparou-se também um branco para a análise elementar a partir de água ultrapura Milli-Q com 1% HNO<sub>3</sub> utilizada na diluição das amostras e padrões, contendo padrão interno na concentração final de 10 µg.L<sup>-1</sup>. Este procedimento foi efectuado imediatamente antes da análise elementar.

A solução de lavagem a ser utilizada entre cada análise (padrões e amostras) foi preparada com água ultrapura Milli-Q e 1% HNO<sub>3</sub> suprapur<sup>®</sup>.

#### *Microsonda Nuclear*

Foram utilizadas amostras de EBC não acidificadas (nativas) e amostras acidificadas. A preparação das amostras de EBC para análise por microsonda nuclear consistiu na deposição de uma gota de 40 µL de amostra sobre uma película de policarbonato de 2 µm de espessura montada num suporte adequado. Após a secagem em vácuo, a amostra foi colocada no sistema experimental a fim de ser analisada.

### 3.2.3 Caracterização química

#### ICP-MS

A análise elementar do EBC foi realizada pela técnica de ICP-MS, uma técnica multielementar, bastante rápida e de elevada sensibilidade, capaz de determinar um elevado número de metais simultaneamente, numa larga gama de concentrações.

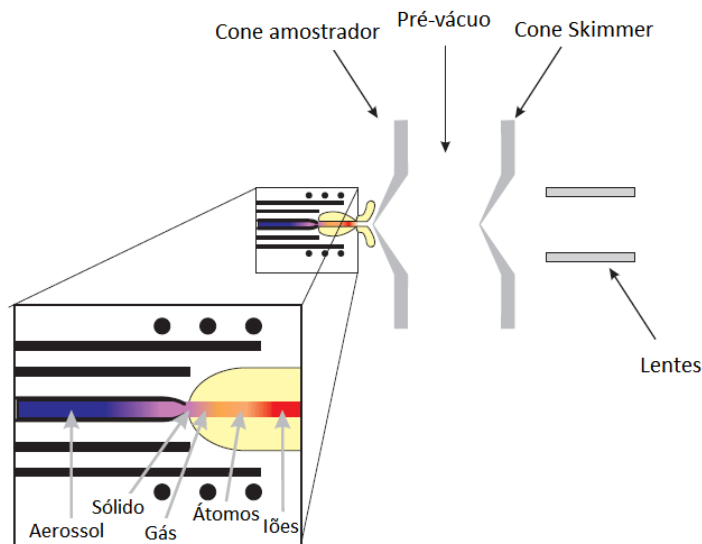
Esta técnica começou a ser desenvolvida na década de 70, com a necessidade de complementar as técnicas elementares já utilizadas, nomeadamente a ICP-AES (do inglês *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*) e assim, minimizar as interferências espectrais e atingir limites de detecção menores de que os alcançados por ICP-AES.[49, 50]

Actualmente, o ICP-MS é largamente utilizado na identificação dos elementos presentes em diversas amostras e com aplicação em diversas áreas como a geoquímica, ambiental e biomonitorização. Esta diversidade deve-se fundamentalmente ao baixo limite de detecção – cerca de 90% dos elementos podem ser determinados com limite de detecção na ordem dos 0,1 a 0,001 µg/L (ppb), ao seu alto grau de selectividade, à sua razoável precisão e exactidão, ao pequeno volume de amostra requerido, à sua celeridade e à capacidade multi-elementar. [49, 51]

O equipamento de ICP-MS é composto por seis partes principais: o sistema de introdução da amostra, a fonte de iões (ICP), a interface, o sistema de lentes, o analisador e o detector.

A análise inicia-se com a introdução da amostra no sistema através de uma bomba peristáltica até ao nebulizador pneumático de fluxo cruzado onde a amostra em estado líquido é transformada num aerossol e de seguida atravessa a câmara de nebulização a fim de serem eliminadas as gotículas de dimensão e velocidade inadequadas à análise. Posteriormente, a amostra é transportada até à tocha do ICP a fim de ser introduzida no plasma de ICP e assim ser ionizada. Para tal, ocorre a passagem de gás árgon (a um fluxo de 0,85 L.min<sup>-1</sup>) em tubos concêntricos de quartzo da tocha acoplados a uma bobina alimentada por um gerador de radiofrequência que quando fornecida energia à bobina, são gerados um campo eléctrico e magnético do terminal da tocha. Assim, quando é aplicada uma descarga eléctrica (faísca) ao árgon presente ocorre a perda de electrões e formação de iões de árgon. Estes são capturados nos campos oscilantes, colidindo com átomos de árgon formando-se o plasma. Uma vez que a temperatura do plasma alcançada é de cerca de 6000 a 10000K, este processo é auto-sustentável e ocorre quase instantaneamente. A amostra é então introduzida no canal central do plasma passando a um estado sólido e de seguida é aquecida até atingir um estado gasoso. À medida que atravessa o canal central do plasma as

moléculas de gás são atomizadas e os átomos formados são ionizados (figura 6). Dado que ocorre uma diminuição da temperatura à medida que o analito deixa a tocha, existe a possibilidade dos iões recombinarem levando à formação de óxidos. [49, 50, 52]



**Figura 6 – Esquematisação das alterações sofridas pela amostra na tocha do ICP-MS e configuração da região da interface.** adaptado de [49]

A formação de partículas carregadas irá permitir que estas interajam com os campos eléctricos e magnéticos para que deste modo sejam separadas de acordo com as suas razões  $m/z$ .

Os iões que emergem da tocha atravessam a região da interface constituída por dois cones com uma abertura de cerca de 1 mm - cone amostrador e cone Skimmer – e uma região de vácuo. A interface tem como principal função reduzir a pressão e a densidade do feixe, minimizando a perda de iões. O feixe de iões com uma pressão atmosférica atravessa o cone amostrador encontrando-se numa região de pré-vácuo (1 Torr) onde sofre expansão. De seguida, atravessa o cone Skimmer atingido uma câmara onde os iões são focalizados para uma lente magnética. É nesta câmara que os iões atingem a pressão adequada ao espectrómetro de massa ( $<1 \times 10^{-4}$  Torr).

Uma vez que os iões gerados no plasma são praticamente todos com carga positiva, estes têm tendência a repelirem-se, pelo que o sistema de lentes electrostáticas instalado logo após a interface permite colimar e focar o feixe de iões para o analisador de massa.[49, 50, 52]

Uma vez no espectrómetro de massa, os iões são separados de acordo com a razão massa/carga. O analisador utilizado é um analisador de massa quadrupolar, compostos por quatro hastes (com 1 cm de diâmetro e 15-20 cm de comprimento) paralelas entre si. As hastes estão conectadas electricamente estabelecendo um

campo bidimensional no plano x-y através da ligação de um par de hastes ao lado positivo e outro par ao lado negativo. Os iões que atravessam este sistema na direcção z são acelerados de acordo com o potencial aplicado nas hastes (5 a 10 V). A combinação correcta de uma voltagem e radiofrequência aplicadas irão permitir que os iões com uma única razão  $m/z$  terão uma trajectória estável durante todo o percurso do quadrupolo, permitindo assim que sejam seleccionados os iões com uma razão  $m/z$  num determinado instante. Este tipo de analisador é o mais usado em espectrometria de massa atómica dado que é mais compacto, mais barato e mais robusto que os outros tipos de analisadores e tem ainda a vantagem possuir uma alta velocidade de varredura, permitindo que um espectro seja obtido em menos de 100 ms. Após a separação dos iões, estes têm de ser contabilizados através do sistema de detecção (multiplicador de electrões). A função do detector é converter o número de iões que atingem o detector em sinal electrónico mensurável e relacionar com o número de átomos desse elemento na amostra, através do uso de padrões de calibração. A superfície activa do detector (dódo) liberta um electrão por cada ião que a atinge. Deste modo, os electrões libertados no primeiro dódo, embatem no segundo dódo onde mais electrões são libertados iniciando-se um processo de amplificação de sinal. Este processo de cascata de electrões continua até ser gerado um pulso electrónico mensurável. Através da contabilização dos pulsos gerados pelo detector, o sistema contabiliza os iões que atingiram o primeiro dódo.[49, 50, 52]

### Estabelecimento da Calibração

O equipamento de ICP-MS utilizado - PerkinElmer ELAN-DRCe, SCIEX, EUA encontra-se instalado na Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do ITN. Utilizaram-se cones de níquel e uma câmara de nebulização de quartzo do tipo ciclónico, arrefecida por um sistema Peltier, adequada a pequenos volumes de amostra.

Para a determinação das concentrações elementares presentes nas amostras efectuou-se uma análise quantitativa recorrendo-se a curvas de calibração externas para cada elemento seleccionado, i.e., Na, Mg, K, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Sr, Cd, Sb, Ba, Pb. Para tal, prepararam-se padrões externos com uma gama de concentrações adequada a cada elemento a partir da solução multielementar Fluka 70008 (Sigma Aldrich) que contém diversos elementos químicos na concentração de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Dado que nesta solução multielementar está ausente o Sb, prepararam-se padrões elementares para a gama de concentrações de interesse a partir de uma solução monoelementar certificada (Sb CertiPUR<sup>®</sup>, Merck,  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ ). A partir destas soluções certificadas prepararam-se padrões para as concentrações de  $0,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $0,5$



$\mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $50\mu\text{g.L}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  por diluição das soluções originais em água ultrapura .

O método de calibração utilizado consistiu na adição de um padrão interno apropriado às soluções de calibração. O padrão interno é um elemento que é adicionado às amostras e aos padrões de calibração garantindo-se que a concentração final de padrão interno é a mesma quer nos padrões de calibração quer nas amostras. O padrão interno é seleccionado de modo a que tenha um potencial de ionização semelhante ao do analito, não esteja presente nas amostras e não interfira com a matriz ou elementos da amostra. Deste modo, foi seleccionado o Ítrio (Y) como padrão interno (Yttrium AAS Standard Solution Specpure,  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A concentração de Y utilizada nas amostras e nos padrões de calibração foi de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Todas as soluções padrão (e as amostras) foram preparadas utilizando água ultrapura. Consequentemente, o branco considerado no procedimento (a descontar a cada padrão e amostra analisada) foi água ultrapura acidificada com 1%  $\text{HNO}_3$  v/v, contendo também o padrão interno.

Os valores de concentração das amostras foram determinados após ser descontado o branco, por interpolação a partir das rectas de calibração obtidas. A aquisição, processamento e análise de dados foi efectuada com o software ELAN 3.4. (Perkin Elmer, SciEX, USA).

Foi ainda utilizado diariamente um padrão de certificado de referência do National Institute of Science and Technology, NIST 1643e, *Trace Elements in Water*, para controlo de qualidade do método.

## **Microsonda Nuclear**

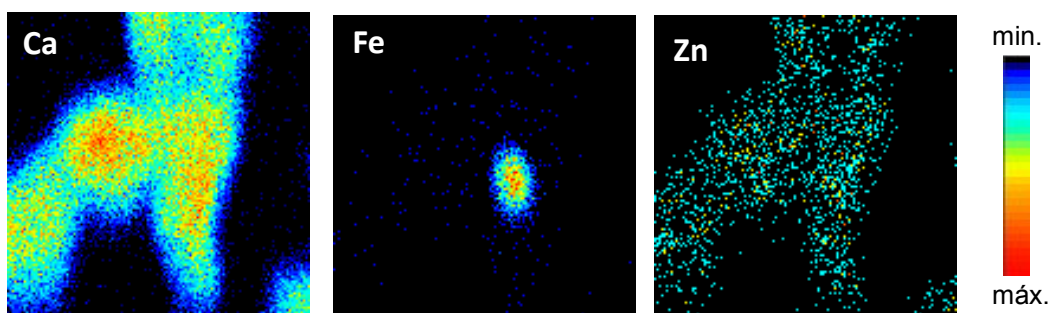
A microsonda nuclear combina várias técnicas e baseia-se na focagem de partículas aceleradas a dimensões micrométricas. Na análise das amostras utilizou-se, em simultâneo, três técnicas: detecção de raios X induzidos por partículas - PIXE (do inglês, Particle Induced X-ray Emission); detecção de partículas transmitidas - STIM (do inglês *Scanning Transmission Ion Microscopy*) que fornece informação sobre a densidade da amostra; detecção de partículas retrodispersas - RBS (do inglês *Rutherford Backscattering Spectrometry*) que se baseia na retrodispersão das partículas do feixe após as colisões e perda de energia provocados pela interacção das partículas que atingem o alvo com os átomos da amostra. Esta técnica de RBS apresenta uma maior resolução para elementos de número atómico menor que 20, pelo que é possível conhecer a proporção dos elementos presentes nas amostras orgânicas – como por exemplo por os átomos leves H, C, O e N – e assim, determinar

as espessuras das mesmas. Esta informação é utilizada para a normalização em massa do espectro de PIXE, pelo que a microsonda nuclear permite análises quantitativas. A combinação simultânea de PIXE com as técnicas de RBS e STIM, permite obter imagens topográficas da densidade e da distribuição elementar assim como obter perfis de concentrações elementares.[53, 54]

A análise das amostras de EBC foi realizada na Microsonda Nuclear instalada na Unidade de Física e Aceleradores do ITN.[55]

Utilizou-se um feixe de prótons de 2,0 MeV focado a dimensões entre 1 e 3  $\mu\text{m}$ . O feixe é deflectido de modo a efectuar o varrimento de uma área da amostra. Para cada posição do feixe, a informação espectral é representada gerando-se assim mapas da região em análise.

Os mapas de densidade ou distribuição elementar gerados são constituídos por uma grelha de 64x64 pixéis, correspondendo a cada ponto um par de coordenadas (x,y) e constituído assim um elemento de pixel. Cada pixel contém um espectro de PIXE, RBS e STIM, que corresponde a uma posição do feixe durante o varrimento da amostra. Deste modo, podem gerar-se mapas a partir do número de eventos registados em cada espectro para cada posição do feixe. Para melhor visualização atribuiu-se um código de cores para o intervalo de valores registado (figura 7).[53]



**Figura 7 – Imagem da distribuição de Ca, Fe e Zn num depósito de EBC sobre um filme de polycarbonato. ( $53 \times 53 \mu\text{m}^2$ ). A representação a partir do código de cores permite distinguir regiões de maior densidade de eventos e a sua morfologia.**

Consequentemente os mapas gerados são qualitativos. A determinação quantitativa dos elementos pode no entanto ser efectuada a partir de pontos/regiões de interesse seleccionados a partir dos mapas gerados. O procedimento utilizado consistiu em recolher informação espectral pontual em regiões pré-estabelecidas, ou seja para posições do feixe definidas e para um nº de prótons que atravessam a amostra conhecido (carga acumulada).

Na microsonda nuclear, todo o controlo das unidades electrónicas como o sistema de varrimento da amostra, integradores de carga, registo dos sinais dos detectores, a

informação da posição do feixe na amostra e o tempo em que permanece em cada uma das posições é efectuado por computador utilizando o sistema de aquisição OMDAQ. A análise quantitativa das amostras efectuou-se recorrendo ao programa DAN32.[56]

Um factor que torna a técnica de microsonda tão interessante e promissora é a capacidade de quantificar elementos vestigiais com uma resolução micrométrica, permitindo ainda visualizar a sua distribuição na amostra.[57]

### 3.3 Caracterização de material particulado em suspensão em ambiente de trabalho

#### 3.3.1 Amostragem do material particulado em suspensão

Na amostragem do material particulado recorreu-se a colectores Gent  $PM_{10}$ , constituídos por uma unidade de filtros em cascata (*Stacked Filter Unit* - SFU) associada a uma bomba de aspiração e a um contador volumétrico de gás (figura 8). O SFU comporta dois filtros em níveis diferentes que permite que no primeiro filtro fiquem retidas as partículas com diâmetro aerodinâmico (DA) entre os 2,5 e os 10  $\mu m$  e no segundo, as partículas com DA inferior a 2,5  $\mu m$ . [12, 58]

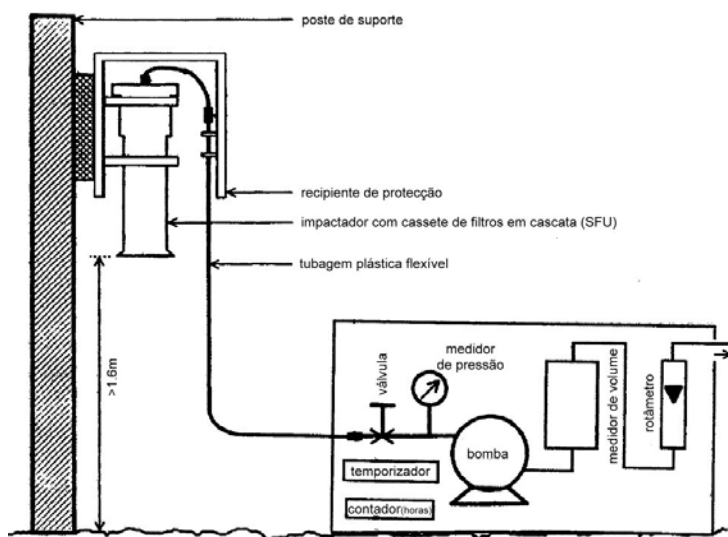


Figura 8 – Esquema do colector Gent  $PM_{10}$ . adaptado de [58]

A recolha das partículas fez-se num fluxo de  $15-16 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  durante cerca de 4h.

Os filtros utilizados na amostragem foram de polycarbonato Nuclepore<sup>TM</sup> de 47 mm diâmetro com poros de 0,4  $\mu m$  para o  $PM_{2,5}$  e 8  $\mu m$  para o  $PM_{2,5-10}$ . Devido à presença de capilares circulares paralelos com diâmetro uniforme, igualmente espaçados e

orientados de forma perpendicular à face do filtro, permitem que a filtração sequencial funcione como um impactador em cascata.[12]

### **3.3.2 Preparação das amostras e análise gravimétrica**

Após a recolha do material particulado, os filtros foram retirados dos SFU e a massa das partículas foi determinada por gravimetria utilizando uma balança *Mettler Toledo* (modelo UMT5). A cada filtro foi medida três vezes a massa antes e após a recolha do material particulado tendo-se efectuado uma média das três medições e a subtracção da massa inicial à massa final. Posteriormente, os filtros foram armazenados em caixas individuais de polycarbonato até análise elementar por PIXE e INAA.

Apesar de não ser necessário qualquer pré-tratamento das amostras, foi fundamental ter todos os cuidados no manuseamento e armazenamento destas para evitar contaminações. Para tal, todo o manuseamento dos filtros efectuou-se numa câmara de fluxo laminar em laboratório limpo.

Para se proceder à análise elementar, os filtros foram divididos sendo uma das metades pesada (de forma a extrapolar as concentrações obtidas para o filtro inteiro) e posteriormente colocada num suporte apropriado para análise por PIXE. Após a preparação das várias amostras, cerca de dez suportes são colocados no porta-amostras de PIXE onde foram analisados. A outra metade também foi pesada, dobrada em várias partes até formar uma pequena esfera que é colocada num envelope individual, feito com um pequeno quadrado de papel de alumínio para posterior irradiação em conjuntos de seis amostras juntamente com 3mm de uma liga de ouro - alumínio, que funciona como comparador.

Para a correcção das massas e concentrações foram ainda utilizados filtros não sujeitos a exposição ambiental (filtros brancos) tratados e analisados da mesma forma que as amostras.

### 3.3.3 Caracterização Química

A determinação elementar dos filtros utilizados na amostragem do ambiente industrial e escritórios foi realizada pelas técnicas PIXE (do inglês *Particle Induced X Ray Emission*) e INAA.(do inglês *Instrumental Neutron Activation Analysis*) A combinação destas duas técnicas multielementares permitiu um aumento do número de elementos calculados bem como a possibilidade de validação dos procedimentos analíticos.

Apesar de não ter sido efectuado testes de exactidão entre as duas técnicas, como a análise de um material de referência adequado à situação em estudo, isto é, um material que possui uma matriz idêntica às amostras e que contempla elementos comuns e na mesma gama de concentração dos valores analisados nas amostras, estudos prévios testaram testaram a exactidão das duas técnicas identificando uma boa resposta das mesmas.[59-61]

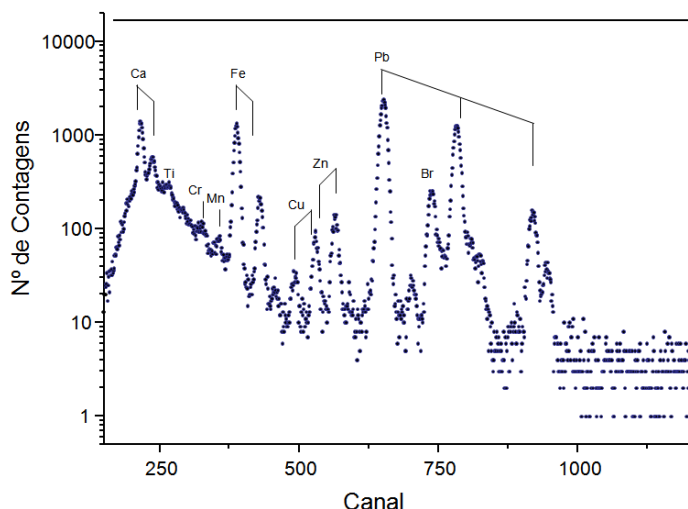
#### PIXE

Uma das técnicas analíticas utilizadas na determinação elementar foi a técnica PIXE que se baseia na análise de raios X emitidos pelos elementos químicos da amostra quando bombardeados com um feixe de partículas aceleradas – neste caso protões – a cerca de 5-10% da velocidade da luz e com alguns MeV de energia, geradas em aceleradores de partículas. A interacção do feixe de protões com os átomos presentes na amostra provoca a excitação dos electrões das camadas mais internas dos átomos que, ao reorganizarem-se electronicamente, regressam ao seu estado fundamental emitindo fotões com energia na banda dos raios X. Uma vez que cada elemento emite um conjunto de raios X característicos, é possível caracterizar os elementos presentes na amostra, pela análise de espectros de emissão de raios X (figura 9).

A análise por PIXE efectuou-se no acelerador de partículas Van de Graaff instalado na Unidade de Física e Aceleradores do ITN. Esta foi realizada em vácuo a uma pressão de  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  Torr e foram adquiridos dois espectros de raios X: um espectro visou determinar os elementos que dão origem a raios X de baixa energia (do Al ao Ca) e foi obtido recorrendo a um feixe de protões com 1 a 1,2 MeV; o outro espectro permitiu detectar os elementos com um número atómico superior a 20 e obteve-se recorrendo a um feixe de protões com 2.1 a 2,3 MeV de modo a aumentar a eficiência de ionização dos átomos de maior nº atómico.

No primeiro caso, os raios X foram detectados pelo detector sem absorvedor e no segundo caso utilizou-se um filtro de Mylar<sup>®</sup> com 350 µm de espessura como

absorvedor dos raios X de menor energia gerados pelos elementos de menor nº atómico. Deste modo foi possível determinar cerca de 20 elementos nas amostras analisadas, e.g., Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Sr, Sn, Sb, e Pb.



**Figura 9 - Espectro de raios X obtido num filtro de recolha de PM<sub>2,5-10</sub> exposto ao ambiente industrial com um feixe de 2,24 MeV e filtro de Mylar® com 350 µm de espessura.**

O nº de raios X detectado para cada elemento por unidade de carga corresponde ao número de átomos presente na amostra. A área do feixe na amostra foi de 20 mm<sup>2</sup>, pelo que a massa de um elemento obtida na área analisada pelo feixe, é posteriormente extrapolada para a massa total no filtro, recorrendo à área total do filtro, que é conhecida.

No sistema experimental de PIXE do ITN, as amostras foram colocadas na câmara de irradiação num porta-amostras controlado por motores passo-a-passo que permitem a movimentação da amostra para a posição pretendida. Os raios X emitidos são detectados por um cristal semiconductor de Si dopado com Li, que se designa por detector de Si(Li) apresentando elevada eficiência para os raios X com energias entre 1 e 20 keV e boa resolução para esta gama de energia (aproximadamente 140 a 160 eV).[53, 54]

Para a quantificação dos elementos de interesse presentes na amostra foi necessário proceder ao cálculo das áreas das diferentes riscas X presentes no espectro de PIXE. Dada a complexidade destes espectros, devida ao número de sobreposições de riscas e ao efeito de *bremsstrahlung* (fundo de radiação resultante da desaceleração dos electrões arrancados), recorreu-se a software apropriado. Foi utilizado o *software* AXIL-PC para desconvolucionar as riscas dos espectros e calcular as áreas dos picos de raios X. A partir dos valores das áreas determinados para cada pico, calculam-se as quantidades absolutas dos elementos presentes tendo em conta os parâmetros

geométricos do sistema experimental, a secção eficaz de ionização e a energia do feixe de protões.[62, 57]

## INAA

A outra técnica utilizada designa-se por INAA e que consiste na activação dos átomos presentes na amostra através da absorção de neutrões térmicos pelo núcleo dos isótopos naturais dos elementos químicos. Em resultado destas reacções nucleares formam-se nuclídeos instáveis radioactivos que, pelo processo natural de decaimento, emitem radiações gama com energia característica. Esta energia permite identificar o isótopo que captura o neutrão e, consequentemente, o elemento químico ao qual o isótopo pertence.

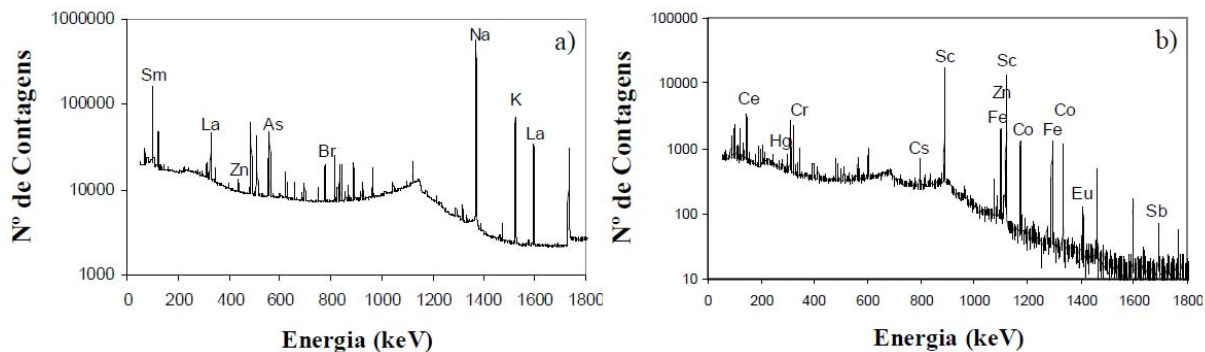
Para a quantificação dos elementos é utilizado o método semi-absoluto denominado método do factor  $k_0$ , que, ao contrário do método relativo, não necessita de padrões e os dados nucleares (normalmente associados a incertezas elevadas) são substituídos por constantes nucleares compostas – factores  $k_0$  – que foram experimentalmente determinadas com elevada exactidão. Este método baseia-se no uso de um elemento (comparador), que é sempre irradiado juntamente com a amostra, sendo a concentração de um dado elemento na amostra determinada com base nesse comparador.

Por questões de agendamento, os filtros de amostragem dos escritórios foram analisados no Reactor Português de Investigação, instalado no ITN enquanto os filtros de recolha do particulado da indústria foram analisados no Reactor de Ensino Superior da Universidade de Delft, Holanda.

Relativamente às condições experimentais no ITN, a irradiação efectuou-se durante cinco horas, com um fluxo de de neutrões térmicos de  $1,03 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Três dias após a irradiação, as amostras são transferidas dos envelopes de alumínio para contentores de polietileno. Para cada amostra, são recolhidos dois espectros: o primeiro espectro obtém-se na semana seguinte à irradiação para a determinação de alguns elementos como o As, Br, Cd, Ga, K e Na e o segundo espectro obtém-se na terceira semana após a irradiação para a determinação dos elementos Ag, Ba, Cr, Fe, Sb, Sr e Zn (figura 10).

Na Universidade de Delft, a irradiação efectuou-se durante cinco horas, com um fluxo de neutrões térmicos de  $5,10 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Após a irradiação são recolhidos três espectros de radiação gama em detectores de germânio hiperpuro: o primeiro espectro obtém-se dois dias após a irradiação, o segundo quatro dias depois e finalmente o terceiro espectro que se obtém na terceira semana.

Por simplicidade e conveniência são escolhidos o ouro (no caso do reactor português) e o zinco (no caso do reactor holandês) como comparadores, uma vez que os seus parâmetros nucleares são bem conhecidos e o seu tempo de meia-vida e a sua única risca gama constituem vantagens na escolha deste isótopo como referência.[12]



**Figura 10 - Espectros de radiação gama obtidos: uma semana após a irradiação (a) e três semanas após a irradiação da amostra (b)** adaptado [12]

Esta técnica é relativamente lenta, não só por não ser *on-line* como a técnica de PIXE, mas porque os isótopos de semi-vida longa (da ordem de dias, meses ou anos) apenas são visíveis após o decaimento total, ou quase total, dos isótopos de semi-vida média (da ordem de horas ou pouco dias).

### 3.4 Análise Estatística

A análise exploratória dos dados foi efectuada recorrendo ao *software IBM SPSS Statistics 18*<sup>®</sup> (SPSS Inc., Chicago, USA) e para a realização dos gráficos foi usado o programa *Microsoft Office Excel 2007* (Microsoft<sup>®</sup>, New Mexico, USA).

As variáveis foram analisadas quanto à sua normalidade e heterogeneidade pelos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As variâncias entre os diferentes grupos foram exploradas estatisticamente através dos testes não paramétricos Mann-Whitney e Wilcoxon. As diferenças entre grupos foram estimadas recorrendo ao teste paramétrico t de Student, sempre que as amostras apresentavam uma distribuição normal ou a testes não paramétricos (Kruskal Wallis e Mann-Whitney). As correlações entre variáveis, foram estimadas pelo coeficiente rho de Spearman (não paramétrico) ou pelo coeficiente de Pearson, se a distribuição das variáveis cumprisse critérios de normalidade.

Os resultados estatísticos foram considerados significativos para um  $p < 0,05$  (intervalo de confiança a 95%).



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização dos grupos de amostragem

A recolha de EBC foi realizada a trabalhadores de uma fábrica de processamento de baterias e a um grupo controlo constituído por indivíduos que trabalhavam em escritórios.

No quadro seguinte apresentam-se os dados demográficos obtidos através do inquérito realizado aquando da recolha de EBC e ainda a concentração média de chumbo no sangue total obtido semestralmente pelos trabalhadores.

**Quadro 1 – Caracterização dos indivíduos do grupo controlo e trabalhadores.**

	Controlo	Trabalhadores
<b>Indivíduos (n)</b>	32	49
<b>Idade-anos<sup>a</sup></b>	32 ± 8	41 ± 10 *
<b>Género masculino (%)</b>	47	90*
<b>Exposição-anos<sup>a</sup></b>	—	14 ± 9
<b>Hábitos tabágicos (%)</b>	19	35
<b>[Pb] no sangue total (µg.dL<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></b>	—	18,1 ± 1,9 (n=16)

<sup>a</sup> valores expressos em média ± desvio padrão

\* diferença significativa relativamente ao grupo controlo p<0,05

Como se pode observar, o grupo dos trabalhadores da fábrica apresenta um maior número de indivíduos e uma maior percentagem de fumadores. Através de testes estatísticos verifica-se que existem diferenças significativas relativamente à idade e ao sexo dos indivíduos. Relativamente aos anos de exposição, esta característica corresponde ao número de anos em que os trabalhadores operam na indústria pelo que não é expressa no grupo controlo.

Relativamente ao chumbo no sangue total, não foi possível saber em tempo útil os valores desta concentração a todos os trabalhadores envolvidos neste trabalho. Apenas para 16 trabalhadores, foi obtida informação relativamente à concentração de Pb no sangue. A média dos níveis de chumbo no sangue nestes trabalhadores foi de 18,1 µg.dL<sup>-1</sup>, valor muito inferior ao estabelecido pelo Decreto-Lei nº247/89 de 21 de Agosto (70 µg.dL<sup>-1</sup>).

## 4.2 Caracterização do EBC

O condensado do ar exalado recolhido nos indivíduos dos grupos de controlo e de trabalhadores foi analisado pelas técnicas de ICP-MS e Microsonda Nuclear de modo a obter informações quanto à sua composição elementar e confirmar a presença de material particulado atmosférico na matriz do EBC, respectivamente.

### 4.2.1 Caracterização elementar do EBC por ICP-MS

As amostras de EBC foram analisadas por ICP-MS no grupo controlo e nas duas recolhas efectuadas no grupo de trabalhadores, início do primeiro dia da semana de trabalho (Recolha A) e no fim do último dia de trabalho (Recolha B). No Quadro 2 indicam-se as concentrações elementares médias obtidas.

**Quadro 2 – Concentrações elementares (ng.mL<sup>-1</sup>) obtidas por ICP-MS no grupo controlo e nas duas recolhas efectuadas no grupo de trabalhadores (Recolha A e B). As concentrações apresentam-se expressas em média e respectivo erro associado.**

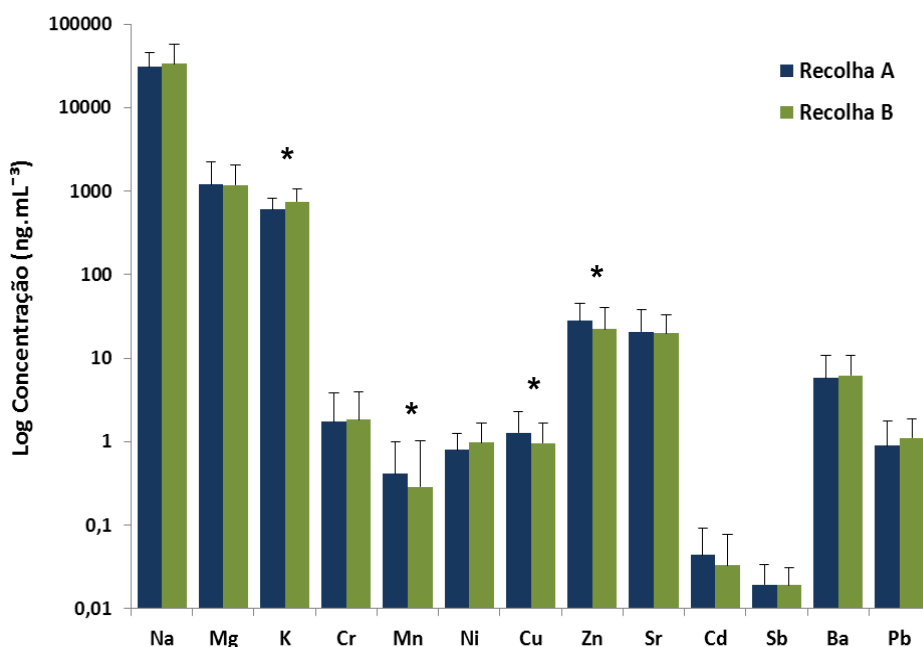
	Controlo $\bar{x} \pm SE$	Recolha A $\bar{x} \pm SE$	Recolha B $\bar{x} \pm SE$
Na	22957 $\pm$ 1298	30914 $\pm$ 2151*	33349 $\pm$ 3504*
Mg	948 $\pm$ 77	1208 $\pm$ 157	1188 $\pm$ 128
K	583 $\pm$ 38	599 $\pm$ 35	750 $\pm$ 44*
Cr	0,808 $\pm$ 0,072	1,74 $\pm$ 0,31	1,84 $\pm$ 0,31
Mn	1,42 $\pm$ 0,40	0,411 $\pm$ 0,089	0,29 $\pm$ 0,11*
Ni	0,387 $\pm$ 0,050	0,804 $\pm$ 0,069*	0,982 $\pm$ 0,096*
Cu	0,600 $\pm$ 0,078	1,29 $\pm$ 0,14*	0,965 $\pm$ 0,105*
Zn	13,0 $\pm$ 2,3	28,0 $\pm$ 2,6*	22,4 $\pm$ 2,6*
Sr	15,2 $\pm$ 1,3	20,9 $\pm$ 2,6	19,8 $\pm$ 1,9
Cd	0,177 $\pm$ 0,114	0,044 $\pm$ 0,008	0,033 $\pm$ 0,007*
Sb	0,015 $\pm$ 0,002	0,019 $\pm$ 0,002	0,019 $\pm$ 0,002
Ba	3,38 $\pm$ 0,33	5,81 $\pm$ 0,72	6,17 $\pm$ 0,65*
Pb	0,323 $\pm$ 0,111	0,897 $\pm$ 0,129*	1,11 $\pm$ 0,11*

\* diferença significativa relativamente ao grupo controlo  $p < 0,05$

Uma vez que os grupos em estudo não apresentavam uma distribuição normal, recorreu-se a testes não paramétricos a fim de verificar a existência de diferenças das concentrações elementares nas Recolhas A e B relativamente ao grupo controlo. Observou-se que existe um aumento significativo das concentrações dos elementos Na, Ni, Cu, Zn e Pb para ambas as recolhas. Verificou-se ainda que a concentração de K no fim do turno semanal se encontrava aumentada ( $p=0.001$ , ver Anexos). Relativamente ao Mn e Cd, estes dois elementos apresentam uma maior concentração no grupo controlo comparativamente com a recolha no grupo dos trabalhadores sendo as diferenças de concentração estatisticamente significativas ( $p=0,031$  para Mn e  $p=0,005$  para Cd).

Verifica-se também uma tendência para um aumento das concentrações de Mg, Cr e Sr, contudo estas não são estatisticamente significantes.

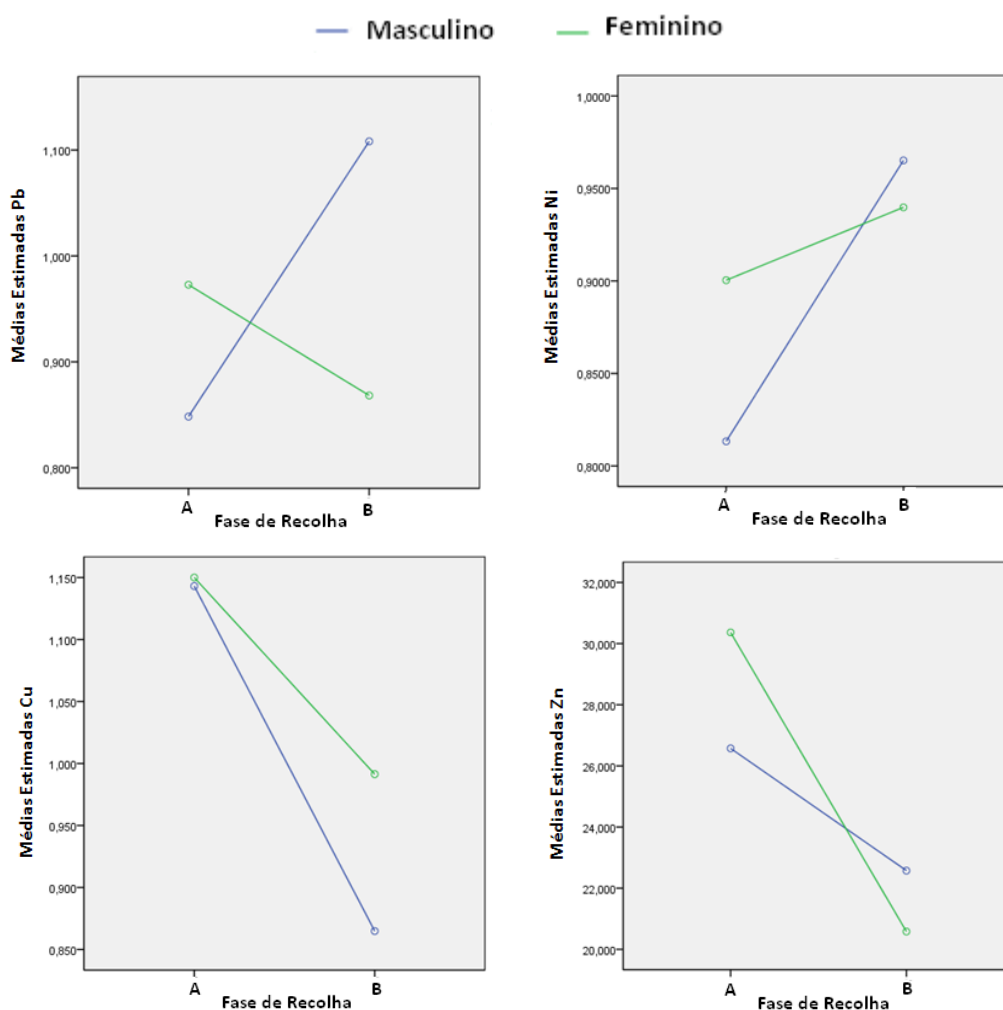
De seguida foi estudada a existência de diferenças significativas das concentrações elementares obtidas entre a Recolha A e a Recolha B, isto é, antes e após os cinco dias de trabalho (figura 11). Através dos resultados obtidos, verifica-se que a existência de um aumento na concentração de K após os cinco dias de trabalho. Esta tendência verifica-se para o Na, Cr, Ni, Ba e Pb contudo sem diferenças estatísticas. Já os elementos como o Mn, o Cu e o Zn apresentam concentrações significativamente menores na segunda recolha.



**Figura 11 – Concentrações elementares obtidas nas recolhas A e B por ICP-MS. O asterisco (\*) refere-se aos elementos que apresentam diferenças significativas entre as recolhas ( $p<0,05$ ).**

Não se verificaram associações significativas entre as concentrações elementares no EBC e a idade do trabalhador, os anos de trabalho e hábitos tabágicos. Também a concentração de Pb no sangue não se correlacionou com a concentração de Pb medida no EBC.

Verificou-se contudo que a variação de concentrações de Pb, Ni, Cu e Zn nas duas recolhas (A e B) eram marginalmente dependentes do sexo. A função de regressão estabelecida associa o maior aumento da concentração de Pb no fim da semana de trabalho aos trabalhadores do sexo masculino, por oposição aos trabalhadores do sexo feminino em que não se observam variações significativas durante a semana de trabalho ( $p=0,835$ ). Como se pode observar na figura 12-1 as médias estimadas para os dois grupos estabelecidos (género feminino e masculino) em cada ponto de recolha (A e B) diferem. Para os elementos Ni, Cu e Zn, as variações observadas para os dois sexos são similares. O incremento (Ni) ou o decréscimo (Cu e Zn) diferiu nos dois géneros embora de forma não significativa (figuras 12-2, 12-3, 12-4).



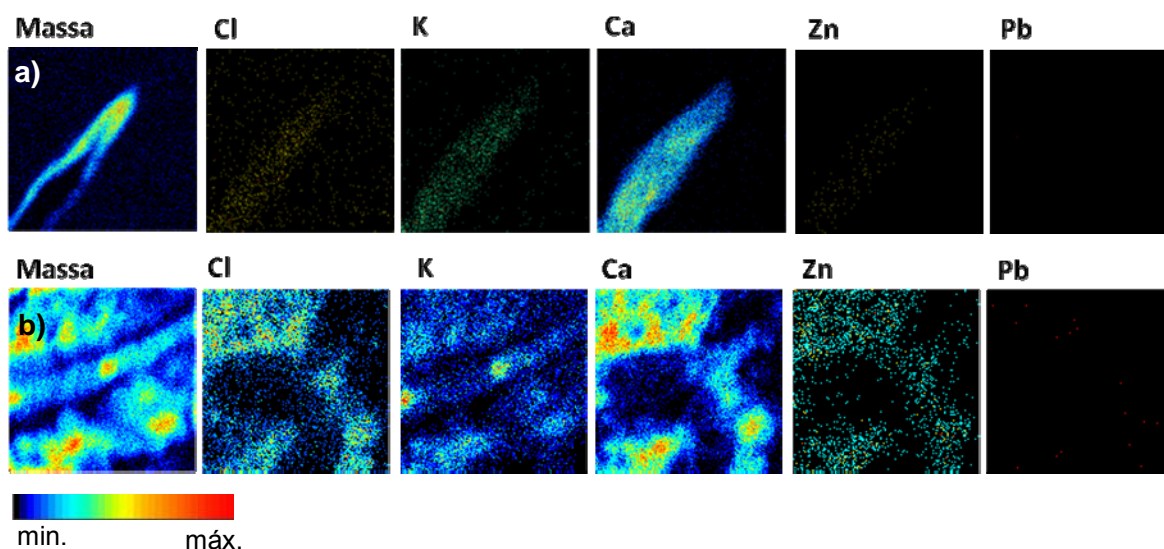
**Figura 12 – Médias estimadas de acordo como o género para os elementos Pb (1), Ni (2), Cu (3) e Zn (4) nas duas recolha de EBC dos trabalhadores.**

#### 4.2.2 Análise de EBC por Microsonda Nuclear

A análise de algumas amostras de EBC por microsonda nuclear permitiu saber se estas apresentavam uma heterogeneidade de matriz, isto é, se existia material particulado suspenso na amostra e que deste modo não permite que a amostra seja eficientemente vaporizada dificultando a sua ionização e que consequentemente, influencia a qualidade dos resultados obtidos por ICP-MS.

Nas amostras do grupo controlo, não eram visíveis partículas ou aglomerados de elevadas dimensões pelo que os elementos como S, Cl, K, Ca, Fe e Zn apresentavam uma distribuição uniforme.

Já nas amostras do grupo de trabalhadores, observou-se a existência de aglomerados de partículas que variavam de tamanho, forma e composição química. Estes eram também possíveis de serem observados por microscopia óptica. Os elementos Cl, K e Ca tinham uma elevada prevalência nas amostras e apresentavam-se, geralmente, em aglomerados que podem ser resultantes da cristalização do fluido pulmonar ou serem componentes do particulado. Quanto ao elemento Zn, este estava presente em elevadas concentrações e que, dependendo da amostra, podia estar uniformemente distribuído ou ser constituinte de partículas (figura 13).



**Figura 13 –** Imagens de densidade e distribuição elemental de alguns metais ( $106 \times 106 \mu\text{m}^2$ ) obtidas em amostras de EBC de um indivíduo controlo (a) e de um trabalhador (b).

Relativamente à análise quantitativa, verificou-se que não existiam diferenças significativas nas concentrações de S, K e Ca entre as amostras controlo e as áreas

ausentes de aglomerados e partículas das amostras do grupo de trabalhadores podendo ter uma origem metabólica do organismo.

A concentração de Cl no grupo de trabalhadores foi mais elevada que no controlo podendo ser associada à sua origem antropogénica e indo de encontro com os resultados obtidos na caracterização ambiental.

Tanto o Cu como o Zn apresentam maiores níveis em todas as amostras do grupo de trabalhadores contudo esta tendência não é significativa. Em relação ao Pb, apenas foi detectado em amostras de trabalhadores. Estes resultados parecem reflectir as características ambientais em que os sujeitos estão inseridos.[63]

Tentou-se ainda comparar quimicamente as amostras dos trabalhadores em diferentes áreas, isto é, zonas onde existiam aglomerados e zonas onde a distribuição elementar parecia ser homogénea. Deste modo, foi possível verificar que os níveis dos elementos Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn e Pb são muito mais elevados nas áreas onde existiam aglomerados e que estas diferenças eram estatisticamente significantes ( $p < 0,01$ ).

A existência dos aglomerados observados ajudou a justificar discrepâncias observadas na quantificação elementar do EBC por ICP-MS e a estabelecer a metodologia de preparação utilizada neste trabalho.[63]

### ***4.3 Caracterização do material particulado em suspensão amostrado em ambiente de trabalho***

Foi realizada a caracterização do material particulado em ambiente de escritório e industrial utilizando quatro amostradores que foram colocados nos estrategicamente nos postos de trabalho das linhas de produção (figura 13). Como referido anteriormente, para a recolha deste material recorreu-se a colectores Gent que permitem separar as duas fracções granulométricas,  $PM_{2,5}$  e  $PM_{2,5-10}$ .

#### **4.3.1 Análise Gravimétrica do material particulado**

Após a amostragem e análise gravimétrica dos aerossóis recolhidos nos dois ambientes, determinou-se a média da concentração mássica do material particulado nas fracções  $PM_{2,5}$  e  $PM_{2,5-10}$ , bem como a média da concentração total ( $PM_{10}$ ). A concentração mássica foi obtida através das massas e volumes de ar obtidos no ensaio (figura 14). Como era espectável, as concentrações do material particulado do

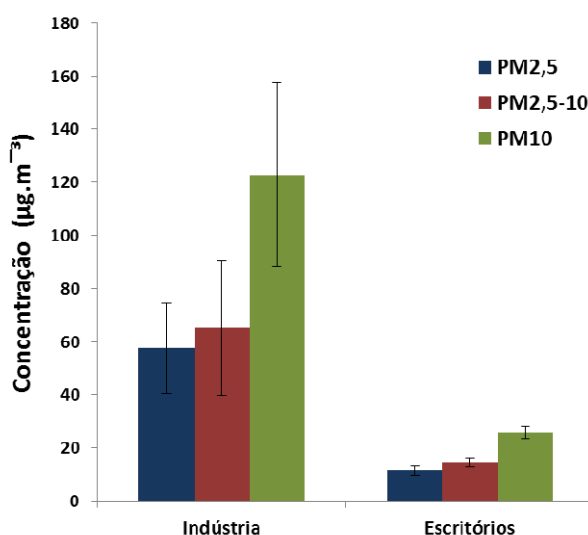
ambiente fabril são significativamente mais elevadas que o ambiente *indoor* (escritório).

Os dados obtidos para o ambiente de escritório foram também utilizados numa tese de mestrado realizada anteriormente no âmbito do projecto FCT/PTDC/AMB/65828/2006.[64]

Estes dados serão também referidos neste trabalho por constituírem o ambiente de referência estabelecido no projecto relativamente aos ambientes fabris investigados.

Relativamente à indústria, as concentrações de  $PM_{2,5}$  e  $PM_{10}$  foram  $58\mu g.m^{-3}$  e  $123\mu g.m^{-3}$ , respectivamente. Com estes resultados é possível constatar que a concentração de  $PM_{10}$  se encontra abaixo do valor limite das partículas respiráveis ( $PM_4$ ), estabelecido pela Norma Portuguesa NP1796-Anexo B ( $3000\mu g.m^{-3}$ ) – Valores limite de exposição profissional a agente químicos

A concentração média obtida para  $PM_{10}$  em ambiente de escritório foi de  $26\mu g.m^{-3}$ , valor muito abaixo dos  $150\mu g.m^{-3}$ , estabelecido pela lei nacional (DL n.º79/06 de 4 de Abril).



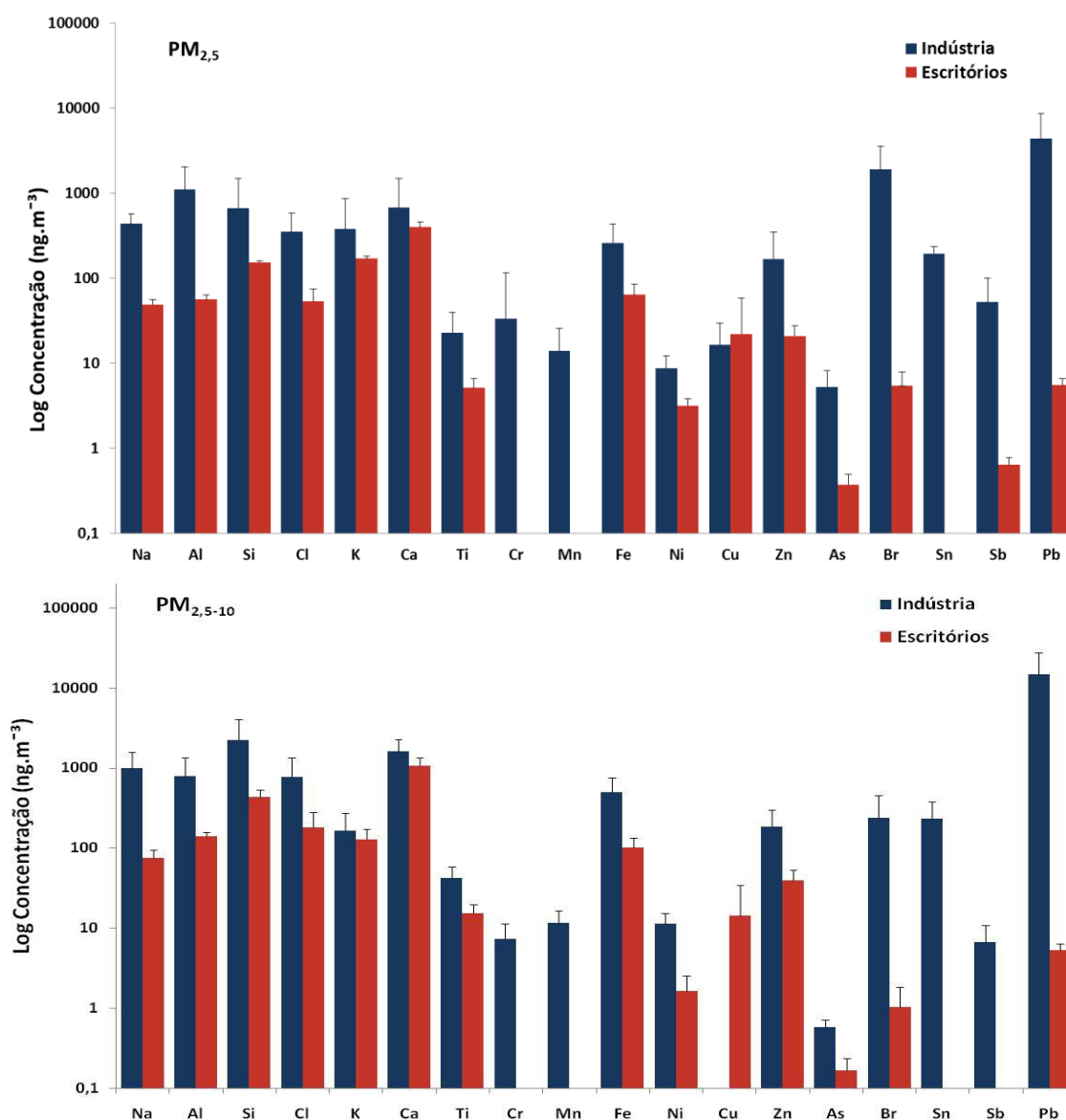
**Figura 14 – Concentrações mássicas do material particulado suspenso no ar ( $PM_{2,5}$ ,  $PM_{2,5-10}$  e  $PM_{10}$ ) nos ambientes de indústria e escritórios.**

#### 4.3.2 Análise elementar do material particulado

A análise da composição do material particulado pelas técnicas utilizadas permitiu a determinação de concentrações mássicas de dezoito elementos. Na figura 15 são apresentadas as concentrações médias obtidas para as fracções fina e grosseira onde se verifica que todos os elementos atingiram concentrações mais elevadas na indústria que no ambiente *indoor*.

Relativamente à indústria, os elementos com concentrações médias mais elevadas no  $PM_{2,5}$  foram o Al, Ca, Br e Pb. e no  $PM_{2,5-10}$  foram o Si, Ca, As e Pb ( ver Anexo). Quanto ao ambiente de escritório, os elementos maioritários foram o Al, Si, Cl, K, Ca, e Fe, elementos considerados de origem natural (solo, no caso do Al, Si, K, Ca e Fe) e mar, no caso do Cl e K).[12, 65, 66]

Verifica-se estatisticamente que, à excepção de K, Ca, Cu e Zn, todos os elementos apresentam diferenças significativas entre o ambiente industrial e ambiente de escritório no particulado fino. O mesmo se conclui para a fracção grosseira, com excepção de K e Ca.



**Figura 15 - Concentrações médias elementares de material particulado nas fracções fina e grosseira em ambiente industrial e de escritório obtidas pelas técnicas PIXE e INAA.**

A maior discrepância nas concentrações elementares obtidas entre os dois ambientes sucedeu-se com o chumbo, elemento essencial no fabrico de baterias. Os valores das



concentrações médias de Pb medidas na indústria foram de 4379 ng.m<sup>-3</sup> para o PM<sub>2,5</sub> e 19217 ng.m<sup>-3</sup> para PM<sub>10</sub>, o que significa que são 800 e 1700 vezes maiores, respectivamente, que as concentrações médias medidas nos escritórios.

A Norma Portuguesa NP1796 estabelece para alguns elementos medidos neste estudo um Valor Limite de Exposição (VLE) para a fracção de partículas inaláveis (particulado em suspensão total). Os valores limite de exposição profissional definem-se como o limite de concentração máxima de uma substância no ar que é considerada segura para a saúde humana. Os VLE podem ser vinculativos (cumprimento obrigatório) ou indicativos (indicam valores a atingir), e aplicam-se a diversos produtos ou sub-produtos resultantes dos processos de produção. Os VLE são uma ferramenta de avaliação de riscos e dão informação valiosa para a actividade de saúde e segurança no trabalho. De um modo geral os VLE são estabelecidos para a exposição de um trabalhador a uma dada substância segundo os critérios de vida profissional de 40 anos com 200 dias de trabalho por ano e 8 horas de trabalho diário, pelo que muitas vezes são designados por valor limite de exposição - média ponderada (VLE-MP).

O Quadro 3 apresenta os VLE-MP referidos pela norma para os elementos medidos na indústria bem como a concentração média obtida no PM<sub>10</sub>. Os valores medidos na fábrica apontam para um cumprimento dos valores apresentados pela norma.

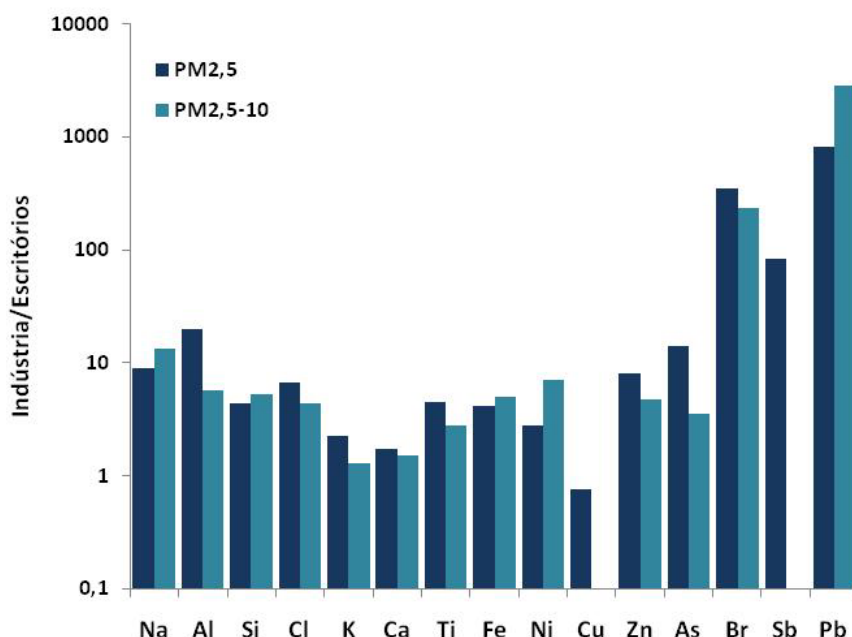
Apesar de não existir um valor limite legislado relativamente à exposição profissional para o material particulado até 2,5 ou 10 µm de DA, os valores obtidos na fábrica apontam para um cumprimento do valor limite de chumbo para a fracção de partículas inaláveis estabelecido (50 000 ng.m<sup>-3</sup>). O mesmo aconteceu para outros elementos.

**Quadro 3 – Concentrações médias de alguns elementos obtidas na indústria (ng.m<sup>-3</sup>) e valores limite - média ponderada (ng.m<sup>-3</sup>) estabelecidos pela Norma Portuguesa NP1796.**

	PM <sub>10</sub> Indústria	VLE-MP
<b>Cr</b>	40	500 000
<b>Mn</b>	21	200 000
<b>Ni</b>	20	1500 000
<b>As</b>	5	10 000
<b>Sn</b>	300	2 000 000
<b>Sb</b>	59	500 000
<b>Pb</b>	19 217	50 000

Na figura 16 estão representadas as razões das concentrações médias do ambiente industrial e dos escritórios para as duas fracções granulométricas. Obtiveram-se

razões elevadas para As, Br, Sb e Pb mostrando a importância do processamento industrial desta fábrica na emissão destes elementos. Quanto ao Cr, Mn e Sn, estes elementos não foram detectados nos filtros do ambiente de escritórios para ambas as frações de particulado. O ambiente da indústria apresenta valores elementares consideravelmente maiores que o ambiente de escritório, havendo uma maior discrepância na razão dos elementos Br, Sb e Pb com uma ordem de grandeza de 300, 80 e 800 vezes superior, respectivamente, para o  $PM_{2,5}$ .

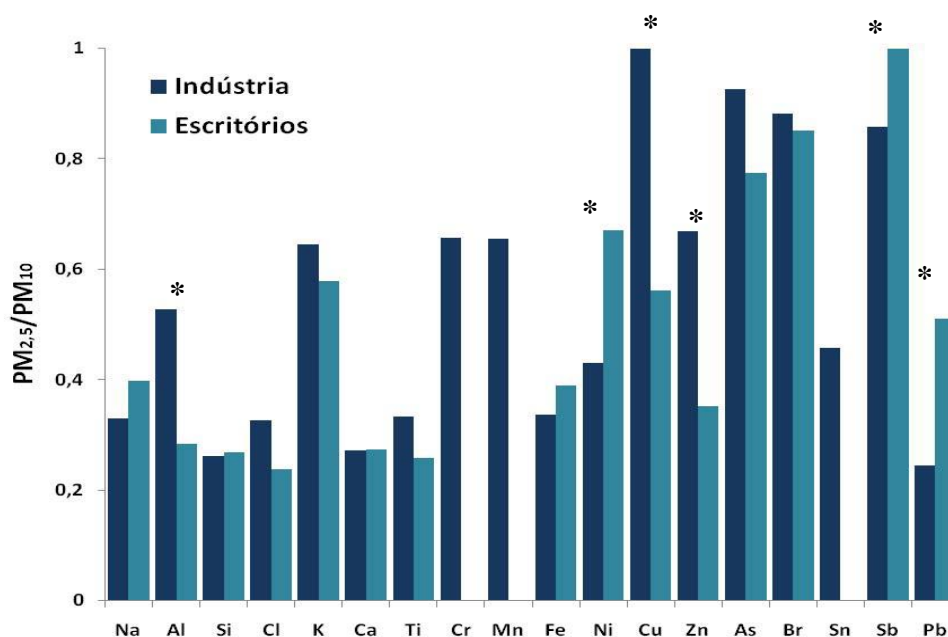


**Figura 16 - Razões entre as concentrações médias elementares do ambiente industrial e escritório.**

De seguida analisaram-se as razões das concentrações médias entre  $PM_{2,5}$  e  $PM_{10}$  dos diversos elementos de forma a conseguir-se ter a percepção da dimensão das partículas associadas aos elementos que estão presentes nos dois ambientes em estudo (figura 17). Esta análise poderá dar informação sobre os processos que estão na origem dos diferentes elementos na indústria: as partículas grosseiras estão mais associadas a processos mecânicos, por exemplo ao processo de corte e limpeza de placas, enquanto as partículas finas estão essencialmente associadas a processos de queima ou soldadura.

As razões dos elementos Na, Si, Cl, Ca, Ti e Fe foram baixas para os dois ambientes não existindo diferenças estatisticamente significativas entre eles ( $p < 0,05$ ). Estes elementos estão normalmente associados a fontes naturais, como o solo e mar, e à fracção grosseira [12, 65, 66]

Relativamente ao Cu, Zn, Br e Sb, as razões determinadas apresentaram diferenças estatísticas entre o ambiente industrial e escritórios. Os valores obtidos na indústria foram 1 para Cu (uma vez que não foi detectado na fracção grosseira), 0,67 para Zn.e 0,89 para Br e 0,86 para Sb o que aponta para uma maior concentração na fracção fina. De acordo com o observado aquando as visitas efectuadas às instalações da fábrica, estes elementos podem advir de pequenas soldaduras que provocam emissão de vapores. Estes vapores poderão dar origem ao particulado secundário fundamentalmente associado a uma granulometria fina. De salientar que alguns amostradores Gent foram colocados estrategicamente sobre estes processos industriais.



**Figura 17 - Razões entre as concentrações médias elementares das duas fracções granulométricas em ambiente industrial e de escritório. O asterisco (\*) refere-se aos elementos que apresentam diferenças significativas entre os dois ambientes ( $p < 0,05$ ).**

As razões de Ni e Pb na indústria foram 0,43 e 0,24, respectivamente, com diferenças estatisticamente significantes, comparativamente ao ambiente de escritório. Através destas razões pode-se concluir que o material particulado encontra-se maioritariamente sob a forma de partículas grosseiras. A existência acentuada de maior concentração de particulado grosseiro face ao particulado fino pode dever-se à existência de uma sala apropriada a cortes de placas de chumbo. Assim, este processo mecânico pode ser considerado fonte de partículas de maiores dimensões. Foram também colocados os aparelhos de amostragem sobre estes postos de trabalho, o que permitiu que houvesse recolha do material particulado antes de haver a aspiração por parte dos meios de extracção das instalações.

## 5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a qualidade do EBC como bio-indicador de exposição a metais no ambiente de trabalho.

Através da determinação das concentrações elementares no EBC, verificou-se um aumento significativo dos níveis de elementos, tais como o Ni, Cu, Zn e Pb, no grupo de trabalhadores por comparação com o grupo de indivíduos não expostos.

A toxicidade do Ni e do Pb é reconhecida. No entanto, os efeitos da exposição aguda e continuada a elementos essenciais, como o Cu e o Zn, é menos estudada.

O Pb é utilizado no fabrico de baterias da unidade industrial constituindo na unidade fabril estudada o maior risco de exposição. O Pb possui diversos mecanismos de actuação no organismo, que resultam principalmente da sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas: é um potente inibidor de enzimas da síntese do hemo; inibe processos de neurotransmissão através do bloqueio de canais de cálcio nos terminais nervosos e afecta o transporte membranar devido à inactivação de ATPases. Estas alterações provocam ainda o aumento do stress oxidativo em células e tecidos, evidenciados em estudos *in vitro* e em modelos animais e no homem, respectivamente. [21, 67-69]

A toxicidade do Ni envolve a modulação de diversas vias metabólicas através de um aumento do stress oxidativo, activação de factores de transcrição, como o Ap1 e o NF- $\kappa$ B entre outros, que regulam processos celulares de diferenciação, de proliferação e de apoptose. Estudos *in vitro* associam a toxicidade do Ni à diminuição de ascorbato nas células o que leva à activação do factor de transcrição HIF-1, indutor de hipoxia celular. A ausência de ascorbato leva ainda ao aumento da síntese de enzimas da glicólise e transportadores da glicose. Numa exposição prolongada a Ni, as células com taxas glicolíticas elevadas sobrevivem e adquirem um fenótipo semelhante a células tumorais. [27, 70]

Como referido, as concentrações de Cu e Zn no EBC dos trabalhadores também se encontravam aumentadas relativamente ao grupo não exposto. Observou-se, contudo, um decréscimo acentuado das concentrações de Cu e Zn ao longo da semana de trabalho. No entanto, a diminuição das concentrações de Cu e Zn no EBC não atinge os níveis observados nos indivíduos não expostos do grupo controlo.

Tanto o Cu como o Zn são elementos químicos essenciais ao organismo, uma vez que participam em diversas vias do metabolismo celular e são co-factores de proteínas reguladores do balanço redox (agentes antioxidantes) como é o caso do superóxido dismutase (SOD).

As acções deletérias conhecidas para a exposição a Zn são reversíveis. [71] Mas o Cu que também é um elemento essencial, quando em excesso no organismo, apresenta toxicidade que está associada ao aumento de espécies reactivas de oxigénio e consequente stress oxidativo. O Cu pode participar directamente em reacções de lipoperoxidação e oxidação de grupos tiol e proteicos. Quando em excesso é captado por proteínas específicas e armazenado. O Cu origina alterações histológicas e bioquímicas em rim, fígado e baço. Um estudo efectuado em ratinhos verificou que nanopartículas de Cu reagem rapidamente com  $H^+$  presente no suco gástrico o que origina um excesso de  $HCO_3^-$  que não é excretado.[27, 72-75]

O aumento de Cu e o Zn nos tecidos induz a expressão de proteínas específicas, como por exemplo a ceruloplasmina e as metalotioneínas, com elevada afinidade para cationes em particular o Cu e o Zn. A ligação destes elementos às metalotioneínas diminui os seus níveis em circulação, que funcionam, desta forma como um reservatório intra-celular para estes elementos essenciais. A ligação do Zn e Cu livre à metalotioneína é o mecanismo conhecido, através do qual são mantidos os níveis fisiológicos intra-celulares de Zn e Cu. O metal ligado à metalotioneína é então armazenado em vesículas do retículo endoplasmático, Golgi e lisossomas. Quando em excesso, é excretado pelas fezes conjuntamente com a metalotioneína a que se encontra ligado.[27, 72-75]

A diminuição de concentração de Cu e Zn no EBC do grupo de trabalhadores ao longo da semana de trabalho poderá reflectir a função homeostática das metalotioneínas assim como a sua retenção por proteínas com papel anti-oxidante como as superóxido dismutases de que estes elementos são co-factores [27, 72-75].

Embora o Zn tenha efeitos protectores como a estabilização de lípidos e proteínas preservando as membranas celulares e macromoléculas de danos oxidativos e controlando mecanismos de sinalização como a inibição da caspase 3 (proposto como o responsável pela degeneração da  $\beta$ -amilóide), uma disponibilidade excessiva de Zn livre induz a apoptose celular através do aumento da expressão de proteínas membranares do mitocôndrio pró-apoptóticas Bax e diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2. O excesso de Zn pode provocar problemas degenerativos devido à indução da actividade do óxido nítrico sintase neuronal que, em conjunto com o radical superóxido origina o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).[20, 75-78]

O Zn activa as proteínas cinase p38, responsáveis pelo início de uma cascata de reacções químicas que levam à apoptose celular. Apesar deste mecanismo de morte celular pelas p38 não estar muito esclarecido, sabe-se actualmente que estas enzimas causam directa ou indirectamente a fosforilação de ionóforos de potássio. A

desregulação dos canais membranares de potássio origina uma diminuição de potássio intracelular, fenómeno há muito associado com a apoptose.[79, 80]

Observando os resultados obtidos para o EBC verifica-se de facto um aumento da concentração de K no EBC dos trabalhadores no final da semana de trabalho o que pode ser expresso pela inactivação dos canais de K do epitélio pulmonar por excesso de metais, entre eles o Zn.

Relativamente ao Cd, a primeira recolha de EBC nos trabalhadores e o grupo controlo apresentaram concentrações semelhantes enquanto na segunda recolha esta teve menores concentrações que as anteriores. O Cd é um elemento não essencial indutor de stress oxidativo, embora não participe na formação de radicais livres (reações de Fenton por exemplo). O mecanismo de actuação do Cd está associado à sua ligação ao glutatióno que conduz à inibição desta proteína e consequentemente ao aumento de radicais livres de oxigénio intracelulares, que por sua vez causam lipoperoxidação e ruptura membranares. Ocorre também a diminuição dos níveis de ATP celular levando à disfunção da membrana mitocondrial e libertação de cálcio e citocromo c para o citoplasma, activando vias de sinalização apoptóticas.[27]

Mais uma vez as metalotioneínas parecem ter um efeito protector relativamente à exposição a Cd, Há evidências da mediação das metalotioneínas na indução de uma pequena tolerância ao cádmio.[27] Deste modo, a diminuição dos níveis de Cd no final da semana de trabalho pode dever-se à sua retenção no interior das células pelas metalotioneínas.

Os níveis de Mn nos trabalhadores revelaram ser mais baixos que no grupo controlo tendo diminuindo ao longo da semana. O Mn é um elemento vestigial essencial ao desenvolvimento normal organismo uma vez que é co-factor de diversos enzimas como a arginase, responsável pela produção de ureia no fígado; a superóxido dismutase, enzima crítico na eliminação do ião superóxido e o piruvato carboxilase, enzima da gluconeogénese. A perturbação da homeostase do Mn por aumento da sua biodisponibilidade tem sido associada a danos neurodegenerativos uma vez que se acumula essencialmente no cérebro. Dado que a toxicidade de diversos elementos incide principalmente no aumento do stress oxidativo celular, a diminuição de Mn no EBC dos trabalhadores pode reflectir o recrutamento deste elemento dado ser um co-factor de proteínas antioxidantes como a superóxido dismutase.[81]

Estudos sobre a exposição e toxicidade do Mn referem que não existe um consenso quanto ao bioindicador fiável na biomonitorização deste elemento. O sangue, a matriz mais utilizada neste tipo de estudos, mostra-se ser um indicador menos relevante na determinação dos níveis de Mn no organismo, uma vez que este elemento é

rapidamente removido da circulação sanguínea, acumulando-se nos tecidos e impedindo que haja uma sensibilidade quanto à exposição. Deste modo, os níveis Mn no organismo podem não ser reflectidos através das trocas gasosas efectuadas entre o sangue e o sistema respiratório.[81]

Quanto à exposição concomitante de elementos tóxicos ao organismo e aos possíveis efeitos sinérgicos dos mecanismos de actuação dos mesmos, um estudo revelou que a co-administração de Cd e As em ratinhos era mais tóxico que a administração individual dos dois compostos. Também o excesso de Zn interfere na absorção celular de outros catiões como por exemplo o Cu e o Mn por competição, dado os transportadores da membrana celular serem os mesmos. Desta forma os efeitos tóxicos de um dado elemento podem ser amplificados ou manifestar-se pela deficiência de outros. Uma vez que existem diversas situações de exposição simultâneas a elementos tóxicos, especialmente em ambiente de trabalho, torna-se fulcral o aumento da investigação neste sentido.[82]

De forma a perceber a exposição a que os trabalhadores estavam sujeitos, efectuou-se uma caracterização ambiental em alguns pontos estratégicos da unidade industrial e ainda do ambiente de escritório que serviu como controlo. Foram estudadas as fracções granulométricas correspondentes a particulado fino ( $PM_{2.5}$ ) e particulado grosseiro ( $PM_{2.5-10}$ ).

O ambiente de escritório apresentou concentrações mais baixas que o ambiente fabril para todos os elementos estudados, confirmando o nível de exposição menor a poluentes dos indivíduos do grupo controlo.

As concentrações elementares no material particulado recolhido na fábrica apresentaram valores cerca de 10 vezes superiores ao ambiente controlo. Estas diferenças foram observadas para ambas as fracções granulométricas  $PM_{2.5}$  e  $PM_{2.5-10}$ . O elemento com maior expressão nas fracções  $PM_{2.5-10}$  e  $PM_{2.5}$  na fábrica foi o Pb, o que era espectável dado ser a matéria-prima utilizada no fabrico de baterias. Outros elementos como o Cr, Sn e Sb cujas concentrações foram cerca de 100 vezes inferiores às concentrações de Pb, apenas foram detectados no ambiente da fábrica. No entanto, as variações observadas no EBC, não reflectiram estas variações. Apesar de se terem verificado níveis médios mais elevados de Cr no EBC dos trabalhadores, as diferenças não foram estatisticamente confirmadas. As variações de Sb nos dois grupos estudados foram pouco relevantes e não foi detectado Sn no EBC. Deste grupo de elementos, apenas as concentrações de Pb reflectiram os níveis de exposição.

Quanto às fracções granulométricas recolhidas, o ambiente industrial apresenta razões  $PM_{2,5}/PM_{10}$  mais baixas e estatisticamente significantes relativamente ao ambiente controlo nos elementos Ni, Sb e Pb. Ou seja, a maior contribuição de Ni, Sb e Pb no ambiente da fábrica é originária do particulado grosseiro. Esta fracção poderá contribuir significativamente para uma maior concentração destes elementos no EBC dos trabalhadores embora a fracção de  $PM_{2,5}$  também apresente níveis relevantes destes elementos. Modelos estabelecidos para a respiração indicam que as partículas de maior diâmetro aerodinâmico ( $PM_{2,5-10}$ ) terão maior probabilidade de deposição nas vias respiratórias superiores, enquanto as menores poderão atingir os alvéolos pulmonares. Como se verificou por microscopia nuclear, as partículas identificadas e visualizadas no EBC tinham dimensões inferiores a  $10\ \mu m$ , podendo ser representativas da fracção  $PM_{10}$ . Estas partículas continham Pb, entre outros elementos, como Ca e Zn, abundantes no ambiente de trabalho. No entanto, não foi detectado Sb ou Ni em associação com as partículas ou matriz de EBC, sugerindo que estes elementos ocorram em partículas com características diferentes de solubilidade, que poderá ser determinante para a sua recuperação pelo processo de recolha, que consistiu na condensação do ar exalado.

O Al, Cu e Zn foram os únicos elementos com razões  $PM_{2,5}/PM_{10}$  significativamente superiores na indústria, revelando estarem presentes maioritariamente como particulado fino. A caracterização microscópica das partículas por microsonda nuclear confirmou a associação do Zn à matriz do EBC. Dada a limitação da resolução do método ( $2-3\ \mu m$ ) o Zn poderá estar dissolvido no meio aquoso do EBC ou estar associado a uma fracção de particulado muito pequena.

O estudo do particulado de EBC por microsonda nuclear permitiu verificar a existência de uma heterogeneidade da matriz nas amostras recolhidas de trabalhadores. A confirmação da presença de aglomerados de partículas nestas amostras permitiu otimizar a metodologia de preparação da amostra para análise elementar por ICP-MS, que consistiu na acidificação e sonificação do EBC.

Os resultados discutidos neste trabalho foram obtidos por diferentes técnicas analíticas que forneceram informação complementar de acordo com o tipo de matriz em estudo. As técnicas de microsonda nuclear permitiram interpretar resultados obtidos por ICP-MS. As técnicas nucleares de INAA e PIXE permitiram obter uma vasta gama de elementos na caracterização do particulado recolhido.

A combinação de INAA e PIXE apresentou uma grande vantagem na análise do particulado atmosférico. Estas duas técnicas possibilitaram aumentar o número de elementos medidos e permitiram validar o processo analítico. São técnicas adequadas



à análise de amostras de aerossóis ambientais por não requererem tratamento prévio das amostras (não exigem a digestão do material particulado nem qualquer outra pré-preparação das amostras), o que facilita o processo analítico, reduz contaminações e perdas inerentes à preparação exigidas pelas técnicas clássicas.

De um modo geral, as diferenças encontradas para os elementos quantificáveis simultaneamente por INAA e PIXE foram de um modo geral diminutas. As diferenças poderão resultar da heterogeneidade da deposição das partículas no filtro. Se para INAA este aspecto não é relevante, dado toda a amostra ser analisada, para PIXE a região do filtro analisada é correspondente à área do feixe de partículas, por conseguinte muito menor. Este factor poderá ter maior relevância para amostras com carga reduzida (menor massa por unidade de volume).

Os resultados obtidos neste estudo permitiram conhecer melhor as características da matriz do EBC e inferir a dinâmica de alguns poluentes no organismo. Este estudo aponta para que o EBC pode futuramente representar uma matriz útil na biomonitorização da exposição ocupacional a Pb.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho foi estudada a exposição a poluentes onde foi possível chegar a resultados conclusivos especialmente na determinação dos níveis de Pb no EBC dos trabalhadores, o metal mais manuseado na unidade industrial seleccionada. Para além da análise dos agentes tóxicos, poder-se-ia também avaliar indicadores do stress oxidativo como os sub-produtos da acção oxidante que resultam da agressão dos poluentes ao organismo. Seria ainda interessante a avaliação de produtos da resposta fisiológica das células, nomeadamente as quimiocinas e proteínas surfactantes no EBC, responsáveis pela regulação da tensão superficial nos ductos respiratórios e alvéolos.

Deveria ainda ser estudadas as diferenças obtidas na variação das concentrações de alguns elementos nas duas recolhas de EBC para os dois sexos a fim de se perceber se estas discrepâncias estão relacionadas com as diferentes funções exercidas na indústria e os respectivos postos de trabalho ocupados.

A presença de aglomerados de partículas observáveis por microsonda nuclear permitiu apurar a necessidade de acidificar e sonificar as amostras. Apesar destes dois passos terem sido incluídos no procedimento analítico, é fundamental estimar a solubilidade dos metais em diferentes ácidos que, dependendo das suas propriedades físico-químicas, podem continuar insolúveis impedindo as determinações analíticas das concentrações. Assim, poder-se-ia assegurar a presença ou ausência de alguns elementos. Um elemento em que isso deve ser efectuado é o Sb dado não se encontrou diferenças entre os grupos em estudo, apesar de ser um dos elementos mais utilizados com o Pb no fabrico de baterias.

De forma a melhorar a validação das metodologias adoptadas, poder-se-ia recorrer à determinação de concentrações elementares de um material de referência com massas certificadas e da mesma ordem de grandeza das amostras para as duas técnicas nucleares INAA e PIXE. Seria ainda importante testar a reprodutibilidade das técnicas e a homogeneidade da amostra através da medição das várias fracções dos filtros pelas mesmas técnicas.

Uma vez que o EBC parece reflectir o ambiente a que indivíduos estão inseridos, seria útil alargar o estudo a outros ambientes fabris de modo a explorar a qualidade do EBC como bio-indicador de exposição a metais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] APOSTOLI, P. 2002. Elements in Environmental and Occupational Medicine. *J. Chromatogr. B.*, 778, 63-97.
- [2] GIDLOW, D. 2004. Lead Toxicity. *Occupational Medicine*, 54, 76-81.
- [3] JÄRUP, L. 2003. Hazards of Heavy Metal Contamination. *British Medical Bulletin*, 68, 167-182.
- [4] TONG, S., SCHIRNDING, E., PRAPAMONTOL, T., 2000. Environmental Lead Exposure: A Public Health Problem of Global Dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*, 78, 1068-1078.
- [5] BAGATIN, E., KITAMURA, S., 2006. História Ocupacional. *J. Bras Pneumol*, 32, 30-34.
- [6] WWW.ACGIH.ORG/PRODUCTS/TLV\_BEI\_INTRO.HTM, acessado a 28 de Novembro de 2009.
- [7] NORMA PORTUGUESA PRNP 2007. Segurança E Saúde Do Trabalho: Valores Limite De Exposição Profissional a Agentes Químicos.
- [8] DOCKERY, D., POPE, C., XU, X., SPRENGLER, J., WARE, J., FAY, M., FERRIS, B., SPEIZER, F., 1993. An Association between Air Pollution and Mortality in Six U.S. Cities. *The New England Journal of Medicine*, 329, 1753-1759.
- [9] 2005. Air Quality Guidelines for Particulate Matter, Ozone, Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide - Summary of Risk Assessment. *WHO Air quality guidelines*.
- [10] MENEZES, M., SABINO, C., FRANCO, M., MAIA, E., ALBINATI, C. 2004. Assessment of Workers' Contamination Caused by Air Pollution Exposure in Industry Using Biomonitoring. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49, 403-414.
- [11] SIVACOMAR, R., JAYABALOU, R., SWARNALATHA, S., BALAKRISHNAN, K. 2006. Particulate Matter from Stone Crushing Industry: Size Distribution and Health Effects. *Journal of Environmental Engineering*, 132, 405-414.
- [12] ALMEIDA, S. 2004. *Composition and Sources of Atmospheric Aerosol in an Urban/ Industrial Region*. Ph. D, Departamento de Ambiente e Ordenamento, University of Aveiro, 255
- [13] PARR, R., STONE, S., ZISLER, R. 1996. Environmental Protection: Nuclear Analytical Techniques in Air Pollution Monitoring and Research. *IAEA Bulletin*, 2, 16-21.
- [14] LADEN, F., NEAS, L., DOCKERY, D., SCHWARTZ, J. 2000. Association of Fine Particulate Matter from Different Sources with Daily Mortality in Six U.S. Cities. *Environ. Health Perspect.*, 108, 941-947.
- [15] MAR, F., GARY, A., KOENIG, J., LARSON, T. 2000. Associations between Air Pollution and Moratlity in Phoenix, 1995-1997. *Environ. Health Perspect.*, 108, 347-353.

- [16] OSTRO, B., HURLEY, S., LIPSETT, M. 1998. Air Pollution and Daily Mortality in the Coachella Valley, California: A Study of Pm<sub>10</sub> Dominated by Coarse Particles. *Environmental Research*, 81, 231-238.
- [17] SCHWARTZ, J., DOCKERY, D., NEAS, L. 1996. Is Daily Mortality Associated Specifically with Fine Particles? *J. Air Waste Manag Assoc*, 46, 927-939.
- [18] POPE, C. 2000. Epidemiology of Fine Particulate Air Pollution and Human Health: Biologic Mechanisms and Who's at Risk? *Environmental Health Perspectives*, 108, 713-723.
- [19] PINHEIRO, T., BUGALHO DE ALMEIDA, A., MONTEIRO, P., ALVAREZ, E., MONIZ, D., ALVES L.C., FREITAS, M.C., 2008. Particulate Matter and Health - from Air to Human Lungs. *Assessment of Levels and "Health-Effects" of Airborne Particulate Matter in Mining, Metal Refining and Metal Working Industries Using Nuclear and Related Analytical Techniques (IAEA)*, 1576, 165-182.
- [20] PLUM, L., RINK, L., HAASE, H. 2010. The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 1342-1365.
- [21] LEE, D., LIM, J., SONG, K., BOO, Y., JACOBS, D. 2006. Graded Associations of Blood Lead and Urinary Cadmium Concentrations with Oxidative-Stress-Related Markers in the U.S. Population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey *Environ Health Perspect* 114, 350-354.
- [22] NAVAS-ACIEN, A., GUALLAR, E., SILBERGELD, E., ROTHENBERG, S. 2007. Lead Exposure and Cardiovascular Disease - a Systematic Review. *Environ Health Perspect*, 115.
- [23] COOPER, R., HARRISON, A., 2009. The Exposure to and Health Effects of Antimony. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 13, 3-9.
- [24] BENCZE, K. 1994. Antimony. In: EDS H.G. SEILER, A. S., H. SIGEL. (ed.) *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. 227-236
- [25] BREGOLI, L., CHIARINI, F., GAMBARELLI, A., 2009. Toxicity of Antimony Trioxide Nanoparticles on Human Hematopoietic Progenitor Cells and Comparison to Cell Lines. *Toxicology*, 262, 121-129.
- [26] IFFLAND, R. 1994. Arsenic. In: EDS H.G. SEILER, A. S., H. SIGEL. (ed.) *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. 237-253
- [27] SHANKER, A. 2008. Mode of Action and Toxicity of Trace Elements. In: PRASAD, M. N. V. (ed.) *Trace Elements: Nutritional Benefits, Environmental Contamination, and Health Implications*. . John Wiley & Sons, Inc.
- [28] MAZUMDER, D. 2008. Chronic Arsenic Toxicity & Human Health. *Indian J Med Res*, 12, 436-447.
- [29] FAURSKOV, B., BJERREGAARD, H., 1997. Effect of Cadmium on Active Ion Transport and Cytotoxicity in Cultured Renal Epithelial Cells (A6). *Toxicology in Vitro*, 11, 717-722.

- [30] MOSHTAGHIE, A., RAISI, A., GOODARZI, H., 1991. A Study of the Effect of Cadmium Toxicity on Serum Proteins and It's Relation to Proteinuria in Male Rats. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 4, 192-195.
- [31] CHRISTENSEN, J. M., KRISTIANSEN, J., 1994. Lead. In: EDS H.G. SEILER, A. S., H. SIGEL. (ed.) *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc.425-440
- [32] BARRY, P. S. 1975. A Comparison of Concentrations of Lead in Human Tissues. *British. Journal. Industrial. Medicine*, 32, 119-139.
- [33] BARBOSA, F., TANUS-SANTOS, J. E., GERLACH, R. F., PARSONS, P. J., 2005. A Critical Review of Biomarkers Used for Monitoring Human Exposure to Lead: Advantages, Limitations, and Future Needs. *Environ. Health Perspect.*, 113 1669-1674.
- [34] MOREIRA, F., MOREIRA, J., 2004. Os Efeitos Do Chumbo Sobre O Organismo Humano E Seu Significado Para a Saúde. *Rev Panam Salud Publica*, 15, 119-129.
- [35] DOSS, M., MÜLLER, W., 1982. Acute Lead Poisoning in Inherited Porphobilinogen Synthase ( $\Delta$ -Aminolevulinic Dehydrase) Deficiency. 45, 131-139.
- [36] WWW.RPI.EDU/DEPT/BCBP/MOLBIOCHEM/MBWEB/MB2/PART1/HEME.H TM, acedido a 7 de Dezembro de 2009.
- [37] SIMONS, T. 1995. The Affinity of Human Erythrocyte Porphobilinogen Synthase for  $Zn^{2+}$  and  $Pb^{2+}$ . *European Journal of Biochemistry*, 234, 178-183.
- [38] MARTIN, C., WERTTZ III C.; DUCATMAN A., 2004. The Interpretation of Zinc Protoporphyrinchanges in Lead Intoxication: A Case Report and Review of the Literature. *Occupational Medicine*, 54, 587-591.
- [39] LUKANOVA, A., TONIOLO, P., ZHITKOVICH, A., NIKOLOVA, V., PANEV, T., POPOV, T., TAIOLI, E., COSTA, M., 1996. Occupational Exposure to Cr(Vi): Comparison Betqeen Chromium Levels in Lymphocytes, Erythrocytes, and Urine. *Int. Arch Occup Environ Health*, 69, 39-44.
- [40] CHRISTENSEN, J. M. 1997. Biological Monitoring of Toxic Metals: Factors Influencing Interpretation of Biomonitoring Results. *Assessment of levels and health-effects of airborne particulate matter in mining, and metal refining and working industries using nuclear and related analytical techniques*.
- [41] SCHALLER, K., DREXLER, J. 2002. Q Uality Assurance of Biological Monitoring in Occupational and Environmental Medicine. *Journal of Chromatography B*, 778, 403-417.
- [42] ANGERER, J., EWERS, U., WILHELM, M., 2007. Human Biomonitoring: State of Art. *Int. J. of Hygiene and Environmental Health*, 210, 201-228.
- [43] EFFROS, R., DUNNING, M., BILLER, J., SHAKER, R., 2004. The Promise and Perils of Exhaled Breath Condensates. *American Journal of Physiology Society*, 287, 1073-1080.
- [44] CORRADI, M., MUTTI, A., 2005. Exhaled Breath Analysis: From Occupational to Respiratory Medicine. *Acta Biomed*, 2, 20-29.

- [45] HORVÁTH, I., HUNT, J., BARNES, P., 2005. Exhaled Breath Condensate: Methodological Recommendations and Unresolved Questions. *European Respiratory Journal*, 26, 523–548.
- [46] MONTUSCHI, P. 2007. Analysis of Exhaled Breath Condensate in Respiratory Medicine: Methodological Aspects and Potential Clinical Applications. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 1, 5–23.
- [47] CAO, W., DUAN, Y., 2006. Breath Analysis: Potential for Clinical Diagnosis and Exposure Assessment. *Clinical Chemistry*, 52, 800-811.
- [48] PENG, G., HAKIM, M., BROZA, Y., BILLAN, S., ABDAL-BORTNYAK, R., KUTEN, A., TISCH, U., HAICK, H., 2010. Detection of Lung, Breast, Colorectal, and Prostate Cancers from Exhaled Breath Using a Single Array of Nanosensors. *British Journal of Cancer*, 103, 542-551.
- [49]. WWW.PERKINELMER.COM, acessado a 13 de Julho de 2010
- [50] NELMS, S. 2005. *Mass Spectrometry Handbook*, Oxford: Blackwell Publishing.
- [51] THOMAS, R. A Beginner's Guide to Icp-MS *Spectroscopy Tutorial* 16, 36-44.
- [52] THOMAS, R. 2004. *Practical Guide to Icp-MS*, New York: Marcel Dekker, Inc.
- [53] PINHEIRO, M., T., . 1994. *Biologia Dos Elementos Vestigiais Na Aterosclerose*. Ph. D, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 200
- [54] JOHANSSON, S. A., CAMPBELL, J. L., MALMQVIST, K. G., 1995. *Particle Induced X-Ray Emission Spectrometry (PXE)*, John Wiley & Sons.
- [55] PINHEIRO, T., YNSA, M., ALVES, L. (2007) IMAGING BIOLOGICAL STRUCTURES WITH PROTON MICROPROBE 2007. Imaging Biological Structures with Proton Microprobe. In: DIAZ, A. M.-V. A. J. (ed.) *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. Badajoz:
- [56] GRIME, G., DAWSON, M. 1995. Recent Developments in Data Acquisition and Processing on the Oxford Scanning Proton Microprobe. *Nucl. Instr. and Meth.* , B104, 107-113.
- [57] NAPOLEÃO, P. 2002. *Caracterização Morfológica E Elementar Em Octopus Vulgaris Cuvier, 1797 Na Costa Portuguesa*. Lic, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 80
- [58] HOPKE, P., XIE, Y., 1997. Characterization of the Ghent Stacked Filter Unit Pm<sub>10</sub> Sampler. *Aerosol Science and Technology*, 27, 726-735.
- [59] FREITAS, M., ALMEIDA, S., REIS, M., OLIVEIRA, O. 2003. Monitoring Trace Elements by Nuclear Techniques in Pm<sub>10</sub> and Pm<sub>2.5</sub>. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 505, 430-434.
- [60] ALMEIDA, S., REIS, M., FREITAS, M.M PIO, C. 2003. Quality Assurance in Elemental Analysis of Airborne Particles. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 207, 434-446.
- [61] ALMEIDA, S., FÉLIX, P., FRANCO, C., FREITAS, M., ALVES, L., PINHEIRO, T. 2010. Using the Exhaled Breath Condensate as a Tool for Non-Invasive Evaluation of Pollutant Exposure. *Int. J. Environment and Health* 4.

- [62] ALVES, J. 1997. *Análise De Sedimentos Em Suspensão Numa Bacia Hidrográfica Poluída*. Lic., Departamento de Química Faculdade de Ciências de Lisboa, 79
- [63] PINHEIRO, T., BARREIROS, M., ALVES, L., FÉLIX, P., FRANCO, C., SOUSA, J., ALMEIDA, S. Particulate Matter in Exhaled Breath Condensate: A Promising Indicator of Environmental Conditions. *Nuclear Instruments Methods B*, submetido.
- [64] FRANCO, C. 2009. *Condensado Do Ar Exalado Como Bioindicador Humano De Exposição Ocupacional a Chumbo*. MSc, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa,
- [65] FROMME, H., DIEMER, J., DIETRIC, S., TWARDILLA, D. 2008. Chemical and Morphological Properties of Particulate Matter (Pm<sub>10</sub>, Pm<sub>2.5</sub>) in School Classrooms and Outdoor Air. *Atmospheric Environment*, 42, 6597-6605.
- [66] LADEN, F., SCHWARTZ, J., SPEIZER, F., DOCKERY, D., 2006. Reduction in Fine Particulate Air Pollution and Mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173, 667- 671.
- [67] COSTA, C., TRIVELATO, G., PINTO, A., BECHARA, E. 1997. Correlation between Plasma 5-Aminolevulinic Acid Concentrations and Indicators of Oxidative Stress in Lead-Exposed Workers. *Clinical Chemistry*, 43.
- [68] KHAKI, A., KHAKI, A. 2010. Antioxidant Effect of Ginger to Prevents Lead-Induced liver Tissue Apoptosis in Rat. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4.
- [69] KASPERCZYK, S., CHOWANIEC, B. 2005. Function of Heart Muscle in People Chronically Exposed to Lead. *Ann Agric Environ Med* 12, 207–210.
- [70] SALNIKOW, K., KASPRZAK, K. 2005. Ascorbate Depletion: A Critical Step in Nickel Carcinogenesis? *Environmental Health Perspectives*, 113, 577-584.
- [71] MARQUES, R., MARREIRO, D. 2006. Aspectos Metabólicos E Funcionais Do Zinco Na Síndrome De Down. *Rev. Nutrição*, 19, 501-510.
- [72] KOBAYASHI, K., KURODA, J., SHIBATA, N., HASEGAWA, T., SEKO, Y., SATOH, M. 2007. Induction of Metallothionein by Manganese Is Completely Dependent on Interleukin-6 Production. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320, 721-727.
- [73] JONAK, C., NAKAGAMI, N., HIRT, H. 2004. Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogenactivated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiol*, 136, 3276-3283.
- [74] CHENA, Z., MENGA, H., XING, G. CHENA, C. 2006. Acute Toxicological Effects of Copper Nanoparticles in Vivo. *Toxicology Letters*, 163, 109-120.
- [75] LYNES, M., KANG, Y., SENSI, S., PERDRIZET, G., HIGHTOWER, L. 2007. Heavy Metal Ions in Normal Physiology, Toxic Stress, and Cytoprotection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113, 159-172.
- [76] LOUNEVA, N., COHEN, J., HAN, L., HAN, L., TALBOT, H., WILSON, R., BENNETT, D., TROJANOWSKI, J., ARNOLD, S. 2008. Caspase-3 Is Enriched in Postsynaptic Densities and Increased in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, 173, 1488-1495.

- [77] BELL, S., VALLEE, B. 2009. The Metallothionein/Thionein System: An Oxidoreductive Metabolic Zinc Link. *ChemBioChem*, 10, 55-62.
- [78] KIM, Y., KIM, E., GWAG, B., SOHN, S., KOH, J. 1999. Zinc-Induced Cortical Neuronal Death with Features of Apoptosis and Necrosis: Mediation by Free Radicals *Neuroscience*, 89, 175-182.
- [79] LENASSI, M., PLEMENITAŠ, A. 2006. The Role of P38 Map Kinase in Cancer Cell Apoptosis. *Radiol Oncol*, 40, 51-56.
- [80] MCLAUGHLIN, B., PAL, S., TRAN, M., PARSONS, A., BARONE, F., ERHARDT, J., AIZENMAN, E. 2001. P38 Activation Is Required Upstream of Potassium Current Enhancement and Caspase Cleavage in Thiol Oxidant-Induced Neuronal Apoptosis. *J Neurosci*, 21, 3303-3311.
- [81] CROSSGROVE, J., ZHENG, W. 2004. Manganese Toxicity Upon Overexposure. *NMR Biomed*, 17, 544-553.
- [82] LIU, J., LIU, Y., HABEEBU, S., WAALKES, M., KLAASSEN, C. 2000. Chronic Combined Exposure to Cadmium and Arsenic Exacerbates Nephrotoxicity, Particularly in Metallothionein-I/Ii Null Mice. *Toxicology*, 147, 157-166



## 8. ANEXOS

**Quadro 4 - Teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação dos grupos de controlo e trabalhadores (Recolha A).**

	<b>Mann- Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>
<b>Na</b>	496	-2,438	0,015
<b>Mg</b>	674	-0,011	0,991
<b>K</b>	699	-0,376	0,707
<b>Cr</b>	619	-0,830	0,407
<b>Mn</b>	659	-0,636	0,525
<b>Ni</b>	280	-3,944	0,000
<b>Cu</b>	271	-4,508	0,000
<b>Zn</b>	295	-4,283	0,000
<b>Sr</b>	675	-0,395	0,693
<b>Cd</b>	452	-1,414	0,157
<b>Sb</b>	576	-1,292	0,197
<b>Ba</b>	548	-1,714	0,087
<b>Pb</b>	189	-5,443	0,000

**Quadro 5 - Teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação dos grupos de controlo e trabalhadores (Recolha B).**

	<b>Mann- Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>
<b>Na</b>	512	-2,397	0,017
<b>Mg</b>	660	-0,616	0,538
<b>K</b>	482	-2,809	0,005
<b>Cr</b>	604	-1,276	0,202
<b>Mn</b>	537	-2,152	0,031
<b>Ni</b>	245	-4,747	0,000
<b>Cu</b>	450	-2,849	0,004
<b>Zn</b>	345	-3,760	0,000
<b>Sr</b>	618	-1,270	0,204
<b>Cd</b>	339	-2,811	0,005
<b>Sb</b>	540	-1,932	0,053
<b>Ba</b>	455	-2,902	0,004
<b>Pb</b>	153	-5,881	0,000

**Quadro 6 - Teste emparelhado de Wilcoxon não paramétrico para comparação da Recolha A e Recolha B**

	<b>Z</b>	<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>
<b>Na</b>	-0,367	0,714
<b>Mg</b>	-0,198	0,843
<b>K</b>	-3,414	0,001
<b>Cr</b>	-0,051	0,959
<b>Mn</b>	-2,387	0,017
<b>Ni</b>	-1,171	0,241
<b>Cu</b>	-2,410	0,016
<b>Zn</b>	-2,409	0,016
<b>Sr</b>	-0,617	0,537
<b>Cd</b>	-1,905	0,057
<b>Sb</b>	-0,069	0,945
<b>Ba</b>	-1,196	0,232
<b>Pb</b>	-1,789	0,074

**Quadro 7 - Teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação das concentrações elementares no fracção PM<sub>2,5</sub> recolhidas na indústria e nos escritórios**

	<b>Mann-Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>
<b>Na</b>	0	-3,024	0,002
<b>Al</b>	6	-2,457	0,014
<b>Si</b>	0	-3,024	0,002
<b>Cl</b>	1	-2,929	0,003
<b>K</b>	22	-0,8	0,424
<b>Ca</b>	32	0	1
<b>Ti</b>	3	-2,74	0,006
<b>Fe</b>	0	-3,024	0,002
<b>Ni</b>	3	-2,74	0,006
<b>Cu</b>	18	-1,2	0,230
<b>xZn</b>	19	-1,228	0,219
<b>As</b>	0	-2,717	0,007
<b>Br</b>	0	-3,024	0,002
<b>Sb</b>	0	-3,024	0,002
<b>Pb</b>	0	-3,024	0,002

**Quadro 8 - Teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação das concentrações elementares na fracção PM<sub>2,5-10</sub> recolhidas na indústria e nos escritórios** Teste não paramétrico

	<b>Mann-Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>
<b>Na</b>	0	-3,024	0,002
<b>Al</b>	2	-2,835	0,005
<b>Si</b>	3	-2,74	0,006
<b>Cl</b>	6	-2,457	0,014
<b>K</b>	27	-0,3	0,764
<b>Ca</b>	20	-1,134	0,257
<b>Ti</b>	3	-2,74	0,006
<b>Fe</b>	0	-3,024	0,002
<b>Ni</b>	0	-3,024	0,002
<b>Zn</b>	3	-2,481	0,013
<b>As</b>	0	-2,324	0,020
<b>Br</b>	0	-3,024	0,002
<b>Pb</b>	0	-3,024	0,002

a. Not corrected for ties

**Quadro 9 - Concentrações elementares e desvios padrão (ng.m<sup>-3</sup>) obtidos na indústria e escritórios para PM<sub>2,5</sub>, PM<sub>2,5-10</sub> e PM<sub>10</sub>.**

	Indústria			Escritórios		
	PM <sub>2,5</sub>	PM <sub>2,5-10</sub>	PM <sub>10</sub>	PM <sub>2,5</sub>	PM <sub>2,5-10</sub>	PM <sub>10</sub>
<b>Na</b>	434 ± 137	1002 ± 590	1436 ± 661	48,8 ± 7,35	75,4 ± 19,0	124 ± 18,4
<b>Al</b>	1095 ± 929	798 ± 545	1893 ± 1196	55,9 ± 7,81	142 ± 14,3	198 ± 16,0
<b>Si</b>	664 ± 824	2230 ± 1871	2894 ± 1927	153 ± 7,75	431 ± 97,4	584 ± 103
<b>Cl</b>	350 ± 231	765 ± 570	1115 ± 756	53,1 ± 21,8	179 ± 99,0	232 ± 118
<b>K</b>	377 ± 487	165 ± 108	508 ± 502	169 ± 13,0	128 ± 43,7	298 ± 48,4
<b>Ca</b>	676 ± 810	1603 ± 695	2279 ± 1006	397 ± 60,9	1073 ± 258	1470 ± 312
<b>Ti</b>	22,9 ± 16,9	42,1 ± 15,6	65,0 ± 24,4	5,14 ± 1,48	15,2 ± 4,35	20,3 ± 5,20
<b>Cr</b>	33,0 ± 81,6	7,23 ± 4,18	39,8 ± 81,7	-	-	-
<b>Mn</b>	14,1 ± 11,4	11,7 ± 4,75	21,1 ± 15,4	-	-	-
<b>Fe</b>	258 ± 176	496 ± 262	755 ± 425	63,8 ± 20,6	101 ± 32,9	165 ± 48,7
<b>Ni</b>	8,70 ± 3,47	11,4 ± 3,90	20,1 ± 5,98	3,16 ± 0,66	1,64 ± 0,89	4,80 ± 1,32
<b>Cu</b>	16,5 ± 13,0	-	16,5 ± 13,0	22,1 ± 35,3	14,3 ± 20,2	36,4 ± 55,4
<b>Zn</b>	167 ± 181	186 ± 113	295 ± 305	20,9 ± 6,52	39,5 ± 13,6	60,4 ± 19,4
<b>As</b>	5,20 ± 2,98	0,60 ± 0,12	5,01 ± 3,36	0,37 ± 0,12	0,17 ± 0,07	0,50 ± 0,20
<b>Br</b>	1886 ± 1678	237 ± 219	2123 ± 1888	5,43 ± 2,44	1,03 ± 0,80	6,46 ± 2,97
<b>Sn</b>	194 ± 41,0	235 ± 146	300 ± 176	-	-	-
<b>Sb</b>	52,4 ± 47,7	6,63 ± 4,07	59,0 ± 50,8	0,64 ± 0,14	-	0,64 ± 0,14
<b>Pb</b>	4379 ± 4264	14839 ± 12575	19217 ± 16723	5,50 ± 1,03	5,30 ± 1,09	10,8 ± 2,04

**Quadro 10- Razões das concentrações elementares  $PM_{2,5}/PM_{10}$  recolhidas na indústria e nos escritórios.**

	<b>Indústria</b>	<b>Escritórios</b>
<b>Na</b>	0,33	0,40
<b>Al</b>	0,53	0,28
<b>Si</b>	0,26	0,27
<b>Cl</b>	0,33	0,24
<b>K</b>	0,64	0,58
<b>Ca</b>	0,27	0,27
<b>Ti</b>	0,33	0,26
<b>Cr</b>	0,66	-
<b>Mn</b>	0,66	-
<b>Fe</b>	0,34	0,39
<b>Ni</b>	0,43	0,67
<b>Cu</b>	1	0,56
<b>Zn</b>	0,67	0,35
<b>As</b>	0,93	0,77
<b>Br</b>	0,88	0,85
<b>Sn</b>	0,46	-
<b>Sb</b>	0,86	1
<b>Pb</b>	0,24	0,51

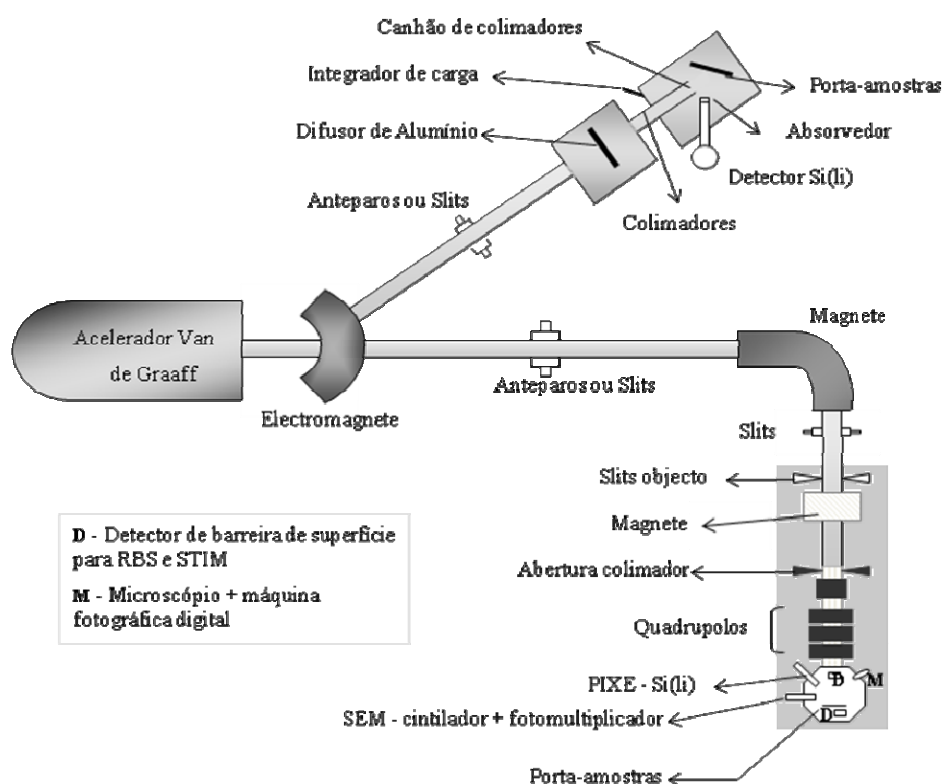
**Quadro 11- Teste não paramétrico de Mann-Whitney para a comparação das razões das concentrações elementares  $PM_{2,5}/PM_{10}$  recolhidas na indústria e nos escritórios.**

	<b>Mann- Whitney U</b>	<b>Z</b>	<b>Asymp. Sig. (2-tailed)</b>
<b>Na</b>	19,000	-1,228	0,219
<b>Al</b>	8,000	-2,268	0,023
<b>Si</b>	23,000	-0,850	0,395
<b>Cl</b>	16,000	-1,512	0,131
<b>K</b>	20,000	-1,000	0,317
<b>Ca</b>	20,000	-1,134	0,257
<b>Ti</b>	27,000	-0,472	0,637
<b>Fe</b>	14,000	-1,701	0,089
<b>Ni</b>	4,000	-2,646	0,008
<b>Cu</b>	,000	-4,206	0,000
<b>Zn</b>	8,000	-2,285	0,022
<b>As</b>	6,500	-1,642	0,100
<b>Br</b>	25,000	-0,661	0,508
<b>Sb</b>	0,000	-3,035	0,002
<b>Pb</b>	2,000	-2,835	0,005

## 8.1 O sistema experimental de PIXE e Microsonda Nuclear

O acelerador Van de Graaff é um acelerador electrostático que utiliza como mecanismo básico a acumulação de carga, transportada por um tapete rolante isolante, contido num tanque pressurizado, de modo a conferir energias de 2 a 3 MeV a feixes de protões com alguns  $\mu\text{A}$  de intensidade de corrente.

O feixe de protões emerge do acelerador e é direccionado para a linha experimental recorrendo a um electromagnete colado à saída do acelerador, o qual gera um campo electromagnético perpendicular ao feixe. Seguidamente, é definida a energia do feixe de protões através da escolha do raio da curvatura do feixe. Com o auxílio de um par de anteparos horizontais, colocado a cerca de 1m da saída do electromagnete, o feixe é delimitado numa fenda e atravessa a uma deflexão de  $25^\circ$  no caso da linha experimental PIXE e  $90^\circ$  no caso da linha de microsonda (figura 17).<sup>[53]</sup>



**Figura 18 - Esquema representativo do sistema experimental de PIXE e microsonda nuclear instalado no ITN.**<sup>[57]</sup>

Posteriormente, o feixe de protões com a energia desejada é colimado de modo a definir uma área de bombardeamento da amostra – no caso do sistema PIXE – e focagem – no caso do sistema da microsonda. O alinhamento dos colimadores segue o plano definido pelo feixe de partículas e o detector e a intersecção do feixe e do

detector definem por sua vez o centro geométrico do sistema, que corresponde ao centro da amostra, posicionada num plano perpendicular ao feixe e ao detector.[53]

Na câmara de irradiação, onde estão presentes as amostras para PIXE, são colocados dispositivos para a detecção de raios X, monitorização do número de prótons incidentes na amostra e um canhão de electrões, a fim de neutralizar as cargas positivas que se vão acumulando em alvos de material isolante.[53, 57]

Quando se pretende fazer uma análise de elementos com altas energias, é colocado um absorvedor entre a amostra e o detector de forma a reduzir ou eliminar os raios X de energias mais baixas correspondentes aos elementos com número atómico inferior ao do potássio. Assim, a análise é efectuada com maior rapidez evitando-se também possíveis interferências causadas por uma elevada taxa de contagem.[53, 57]

No detector, por cada raio X detectado, é gerado um sinal eléctrico que é processado por um amplificador e recolhido num analisador multicanal. Por fim, este encontra-se acoplado a um computador que permite que o espectro resultante de cada amostra seja registado e subsequentemente analisado.

Na câmara da microsonda nuclear existe um porta-amostras, um microscópio e uma máquina digital ligada a um televisor, que facilitam a focagem e posicionamento do feixe e das amostras.